

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSKINETIK
AM REZIDIVIERENDEN
HARDING-PASSEY-MELANOM DER MAUS
NACH SUBKURATIVER BESTRAHLUNG**

Michael Gerte

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0084

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. O. Hug†

Untersuchungen zur Wachstumskinetik
am rezidivierenden Harding-Passey-Melanom der Maus
nach subkurativer Bestrahlung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Gerte

aus

München

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K.-R. Trott

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.3.1979



Die Anregung zu dieser Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. O. Hug gegeben. Für sein stetes Interesse an dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung schulde ich ihm großen Dank. Sein Tod am 22.3.1978 machte mich sehr betroffen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-R. Trott und Herrn Dr. J. Kummermehr bin ich für den sachkundigen Rat und die zahlreichen, ausführlichen Diskussionen beim Entstehen dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch den Assistentinnen des Strahlenbiologischen Instituts für die Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten.

Ohne die großzügige Bereitstellung von Arbeitsraum, technischen Geräten und Versuchsmaterial durch die Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg bei München wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

MEINEN ELTERN GEWIDMET

1.1	Einleitung	1
1.2	Die Eltern	2
1.3	Die Kindheit	3
1.4	Die Jugend	4
1.5	Die Ehe	5
1.6	Die Kinder	6
1.7	Die Eltern	7
1.8	Die Kindheit	8
1.9	Die Jugend	9
1.10	Die Ehe	10
1.11	Die Kinder	11
1.12	Die Eltern	12
1.13	Die Kindheit	13
1.14	Die Jugend	14
1.15	Die Ehe	15
1.16	Die Kinder	16
1.17	Die Eltern	17
1.18	Die Kindheit	18
1.19	Die Jugend	19
1.20	Die Ehe	20
1.21	Die Kinder	21
1.22	Die Eltern	22
1.23	Die Kindheit	23
1.24	Die Jugend	24
1.25	Die Ehe	25
1.26	Die Kinder	26
1.27	Die Eltern	27
1.28	Die Kindheit	28
1.29	Die Jugend	29
1.30	Die Ehe	30
1.31	Die Kinder	31
1.32	Die Eltern	32
1.33	Die Kindheit	33
1.34	Die Jugend	34
1.35	Die Ehe	35
1.36	Die Kinder	36
1.37	Die Eltern	37
1.38	Die Kindheit	38
1.39	Die Jugend	39
1.40	Die Ehe	40
1.41	Die Kinder	41
1.42	Die Eltern	42
1.43	Die Kindheit	43
1.44	Die Jugend	44
1.45	Die Ehe	45
1.46	Die Kinder	46
1.47	Die Eltern	47
1.48	Die Kindheit	48
1.49	Die Jugend	49
1.50	Die Ehe	50
1.51	Die Kinder	51
1.52	Die Eltern	52
1.53	Die Kindheit	53
1.54	Die Jugend	54
1.55	Die Ehe	55
1.56	Die Kinder	56
1.57	Die Eltern	57
1.58	Die Kindheit	58
1.59	Die Jugend	59
1.60	Die Ehe	60
1.61	Die Kinder	61
1.62	Die Eltern	62
1.63	Die Kindheit	63
1.64	Die Jugend	64
1.65	Die Ehe	65
1.66	Die Kinder	66
1.67	Die Eltern	67
1.68	Die Kindheit	68
1.69	Die Jugend	69
1.70	Die Ehe	70
1.71	Die Kinder	71
1.72	Die Eltern	72
1.73	Die Kindheit	73
1.74	Die Jugend	74
1.75	Die Ehe	75
1.76	Die Kinder	76
1.77	Die Eltern	77
1.78	Die Kindheit	78
1.79	Die Jugend	79
1.80	Die Ehe	80
1.81	Die Kinder	81
1.82	Die Eltern	82
1.83	Die Kindheit	83
1.84	Die Jugend	84
1.85	Die Ehe	85
1.86	Die Kinder	86
1.87	Die Eltern	87
1.88	Die Kindheit	88
1.89	Die Jugend	89
1.90	Die Ehe	90
1.91	Die Kinder	91
1.92	Die Eltern	92
1.93	Die Kindheit	93
1.94	Die Jugend	94
1.95	Die Ehe	95
1.96	Die Kinder	96
1.97	Die Eltern	97
1.98	Die Kindheit	98
1.99	Die Jugend	99
1.100	Die Ehe	100

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL, VERSUCHSANORDNUNG, METHODEN	
2.1.1	Tiermaterial	2
2.1.2	Transplantation der Tumoren	2
2.1.3	Messung der TumorgroÙe	2
2.1.4	Kriterien für die Auswahl des Versuchsmaterials	3
2.1.5	Versuchsaufbau	3
2.1.6	Bestrahlung der Tumoren	4
2.1.7	Markierung der proliferierenden Tumorzellen mit Tritium-Thymidin	5
2.1.8	Histologische und autoradiographische Aufarbeitung des Tumormaterials	6
2.2.1	Mikroskopische Auswertung der Autoradiogramme	6
2.2.1.1	Bestimmung des Markierungsindex (labeling index)	7
2.2.1.2	Bestimmung des Prozentsatzes markierter Mitosen (PLM = percentage of labeled mitoses)	7
2.2.1.3	Bestimmung der Zelldichte	8
2.2.2	Morphometrische Auswertung der Tumorschnitte	8
3.	ERGEBNISSE	
3.1	Unbestrahltes Harding-Passey-Melanom	9
3.1.1	Morphometrische Bestimmung der Tumornekrose	9
3.1.2	Histologisches Bild	10
3.1.3	Markierungsprofil in einem unbestrahlten Tumor	11
3.1.4	Markierungsindex im unbestrahlten Tumor	14
3.1.5	PLM-Kurve des unbestrahlten HPM und die daraus bestimmbare Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen	19
3.1.6	Bestimmung der Tumorverdopplungszeit	21
3.2	Bestrahltes Harding-Passey-Melanom	22
3.2.1	Rezidiv nach Bestrahlung mit 30 Gy	22
3.2.1.1	Histologie und Morphometrie	22
3.2.1.2	Markierungsindex im bestrahlten Tumor (30 Gy)	25
3.2.1.3	PLM-Kurve des mit 30 Gy bestrahlten HPM und die daraus bestimmbare Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen	30

3.2.1.4	Bestimmung der Tumorverdopplungszeit des Rezi- divs (30 Gy)	31
3.2.2	Rezidiv nach Bestrahlung mit 20 Gy	35
3.2.2.1	Histologie und Morphometrie	35
3.2.2.2	Markierungsindex im bestrahlten Tumor (20 Gy)	35
3.2.2.3	Bestimmung der Tumorverdopplungszeit des Rezi- divs (20 Gy)	37
4.	DISKUSSION	
4.1	Vergleich der Dauer des Zellzyklus und seiner ein- zelnen Phasen der <u>unbestrahlten</u> Kontrolle und nach Bestrahlung mit 30 Gy	39
4.2	Volumenverhältnis von vitalem zu nekrotischem Gewebe	46
4.3	Überlegungen zur Proliferationskinetik des HPM vor und nach Bestrahlung	49
5.	ANHANG: HISTOLOGISCHE TECHNIKEN	
5.1	Einbettung von Gewebsscheibchen in Methacrylat	56
5.2	Hämalaun-Eosin Färbung der Autoradiogramme	57
6.	ZUSAMMENFASSUNG	58
7.	LITERATURVERZEICHNIS	60
	LEBENS LAUF	65

1. EINLEITUNG

Das Wachstum solider Tumoren ist vor allem für transplantable Tumorsysteme von Nagern in den letzten Jahren ausführlich untersucht worden. Von vielen Tumoren unterschiedlicher Histologie wurden makroskopische Wachstumskurven erstellt und die zellulären Proliferationsparameter autoradiographisch bestimmt (25,31,32,34). Für das makroskopische Wachstum lassen sich zum Teil Gesetzmäßigkeiten formulieren, wie zum Beispiel das exponentielle Wachstum oder das Gompertz-Wachstum (23).

Relativ wenig wurde die Wachstumskinetik nach Bestrahlung der Tumoren mit subkurativen Dosen analysiert, obwohl die Wachstumskurven häufig gemessen und als Wachstumsverzögerung (regrowth delay) quantifiziert wurden (10,11,22). Bei einer Durchsicht veröffentlichter Daten stellt sich heraus, daß nur in Ausnahmefällen die Wachstumsgeschwindigkeit des Rezidivs dem Wachstum der unbestrahlten Kontrolle wieder vergleichbar wird (18,24). In der Regel kommt es nach Bestrahlung zu einer mehr oder weniger deutlichen Abnahme der Wachstumsrate (9,10,11,22,41).

Theoretisch kann diese Retardierung durch eine Verminderung der Zellproduktion, beispielsweise durch verlängerte Zellzykluszeit, eine Abnahme der am Wachstum beteiligten Zellpopulation oder auch durch einen erhöhten Zellverlust bedingt sein. Denkbar sind jedoch auch Veränderungen in der Gewebszusammensetzung mit Erhöhung von Stroma- und fibrotischen oder nekrotischen Anteilen, die unter anderem durch strahlenverursachte Gefäßschäden mit daraus resultierender Hypoxie bedingt sind.

Das Harding-Passey-Melanom (15), ein transplantables Melanom der Maus, weist besonders deutlich eine strahleninduzierte Wachstumsretardierung auf, die sich zudem über einen größeren Dosisbereich als dosisabhängig erweist. Nach Bestrahlung des Tumors mit einer relativ hohen, noch nicht kurativen Dosis von 30 Gy wurde in dieser Arbeit eine Analyse der strahleninduzierten Wachstumsveränderung versucht.

2. MATERIAL, VERSUCHSANORDNUNG, METHODEN

2.1.1 Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten männliche Albinomäuse vom Stamm NMRI-Neuherberg, die mit Standardfutter Altromin (Altrogge-Spezialfutterwerk, Lage) und Wasser ad libitum gehalten wurden. Am Tag der Transplantation waren die Tiere 8 bis 10 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 35 bis 40 g.

2.1.2 Transplantation der Tumoren

Als transplantables Tumorsystem diente das Harding-Passey-Melanom (HPM) der Maus. Die hier verwendete Tumorserie wurde 1971 von Dr. Gericke vom Tumorklaboratorium der Farbwerke Hoechst zur Verfügung gestellt und seitdem auf männlichen NMRI-Mäusen weiterpassagiert.

Spendermäusen mit erbs- bis kirschgroßen, subkutan gelegenen Melanomen wurde der Tumor unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und mit einer Rasierklinge in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm aufgeschnitten. Für den Versuch wurden nur die makroskopisch vital erscheinenden Tumorstücke verwendet, die nekrotischen Anteile wurden verworfen.

Bis zur Injektion wurden die Gewebstückchen in isotone Kochsalzlösung gelegt und dann mit einem Trokar subkutan in die dorsale, rechte Thoraxseite der mit Äther narkotisierten Empfängertiere implantiert. An dieser Stelle wurde vorher das Fell geschoren, weil dadurch die Tumoren besser zu beobachten und zu messen waren. Die Transplantation war spätestens 20 min nach der Tötung der Spendermaus abgeschlossen.

2.1.3 Messung der Tumorgroße

Ungefähr 8 Tage nach Implantation war bei den meisten Tieren subkutan ein kleiner, pigmentierter Tumorknoten palpabel. Wenn er nach 11 bis 12 Tagen ein Gewicht von etwa 80 mg erreicht hatte, wurde seine Größe jeden zweiten oder dritten

Tag gemessen. Dies geschah mit einer Plexiglasschablone, die kreisrunde Löcher mit steigendem Durchmesser enthielt. Jeder Durchmesser entsprach einem bestimmten Tumorgewicht, was durch bereits vorliegende Kalibrierungsmessungen bestimmt worden war. Die Zuverlässigkeit eigener Messungen wurde in Vorversuchen geprüft und bestätigt. Die Bohrung, die vom Tumor genau ausgefüllt wurde, gab das entsprechende Tumorgewicht an.

2.1.4 Kriterien für die Auswahl des Versuchsmaterials

Die Tumoren mußten bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um für die Versuche verwendet zu werden. Für die Durchführung einer korrekten Größenmessung mußten sie annähernd Kugelform haben. Außerdem durften sie weder mit der Haut noch mit der Thoraxwand verwachsen sein, damit sie gut durch die Bohrungen der Schablone geführt werden konnten.

Für die Versuche wurde ferner einigermaßen homogene Wachstumsgeschwindigkeit vorausgesetzt. Deshalb wurden nur Tiere verwendet, deren Tumor zwischen dem 12. und 16. Tag nach Transplantation ein Gewicht von 80 bis 120 mg hatte. Schneller oder langsamer wachsende Tumoren wurden nicht verwendet. Die Tumorangequote betrug 90 %. Die genannten Voraussetzungen erfüllten ca. 60 % der transplantierten Tumoren.

2.1.5 Versuchsaufbau

Die Tiere, die die Versuchsbedingungen erfüllten, wurden randomisiert und in drei Gruppen aufgeteilt. Neben der unbestrahlten Kontrollgruppe wurden zwei Gruppen mit Einzeldosen von 30 Gy in Luft, bzw. 20 Gy in Luft bestrahlt.

	Anzahl der Tiere	Dosis in Gy
1. Gruppe	100	0
2. Gruppe	120	30
3. Gruppe	20	20

2.1.6 Bestrahlung der Tumoren

Die Bestrahlung der Tiere erfolgte mit dem Röntgengerät MG-300 der Firma C. H. Müller bei einer Röhrenspannung von 300 kV, einem Röhrenstrom von 10 mA und einer Filterung durch 0,5 mm Cu und 1,0 mm Al. Im Fokus-Hautabstand von 20 cm betrug die Dosisleistung 4,3 Gy/min.

Durch einen Bestrahlungstubus mit zweimaliger Ausblendung war das Bestrahlungsfeld auf 20 mm Durchmesser festgelegt. Die Schwankung der mit Röntgenfilm photometrisch vermessenen Homogenität der Dosis im Bestrahlungsfeld betrug weniger als ± 5 %. Mit Hilfe einer 17 cm von der Anode entfernt liegenden Victoreen-Ionisationskammer mit nachgeschaltetem Radocon-Dosimeter wurde bei jeder Bestrahlung die Einfallsdosis gemessen. Das Erreichen der vorgegebenen Dosis wurde durch das Radocon akustisch signalisiert. Regelmäßige vergleichende Messungen dieser Dosimetrievorrichtung mit einem Fricke-Dosimeter ergaben Abweichungen, die weniger als ± 10 % betrugen.

Für die Bestrahlung wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von 0,25 bis 0,30 ml 2 %-igem Evipan^R narkotisiert. Mit Klebestreifen wurden sie auf höhenverstellbaren Ständern so fixiert, daß sich der Tumor exakt im Zentrum des Bestrahlungsfeldes und die Tumormitte genau auf Höhe der Tubusunterkante befand.

Eine Gruppe von Tieren wurde mit einer Dosis von 30 Gy bestrahlt, eine zweite, kleinere Gruppe von Tieren mit 20 Gy. Nach Bestrahlung stellten sich die typischen Hautveränderungen wie Erythem, Epilation und feuchte Desquamation ein, und zwar nach 30 Gy wesentlich stärker als nach 20 Gy. Durch diese akuten Hautveränderungen war die Messung für eine Zeit von etwa 2 bis 3 Wochen erschwert. In der Regel kam es jedoch zur Abheilung.

Allerdings trat im späteren Verlauf eine strahlenbedingte Hautfibrose auf, die die Messung stark behinderte. Außerdem war das Rezidiv meistens nicht kugelig, sondern unregelmäßig und flach geformt. Von der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe schied ein Drittel aller Tiere aus dem Versuch aus, da das

Tumorrezidiv infiltrierend in die Haut einwuchs und ab der 6. Woche nach Bestrahlung ulzerierte. Dabei entleerte sich aus der Tumorkapsel schwärzliche Koagulationsnekrose. Dadurch war eine exakte Messung nicht mehr möglich.

2.1.7 Markierung der proliferierenden Tumorzellen mit Tritium-Thymidin

Wenn die unbestrahlten Tumoren und die Rezidive der bestrahlten Tumoren ein Gewicht zwischen 500 und 700 mg erreicht hatten, wurde den Tieren 0,01 ml/g Körpergewicht Tritium-Thymidin intraperitoneal injiziert. Diese Tritium-Thymidin-Lösung lag in einer auf 200 μ Ci/ml verdünnten Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 2-5 Ci/mMol vor (Hersteller: Amersham/Buchler, Braunschweig). Um wieder eine homogen wachsende Tumorphilpopulation zu haben, wurden die sehr schnell und die sehr langsam wachsenden Tumoren hierfür nicht verwendet.

- Zur Bestimmung des Markierungsindex wurde jeweils 10 unbestrahlten, mit 20 Gy und mit 30 Gy bestrahlten Tieren Tritium-Thymidin injiziert. Eine Stunde später wurden die Tiere getötet.
- Zur Untersuchung des Verlaufs markierter Mitosen (PLM-Kurven) wurden von den unbestrahlten und von den mit 30 Gy bestrahlten Tieren in stündlichem Abstand bis zu 36 Stunden post injectionem jeweils zwei Tiere pro Gruppe getötet, so daß für jede Gruppe 72 Tiere benötigt wurden.

Der Injektionszeitpunkt wurde so gewählt, daß die Tötung der Tiere einheitlich um 16 Uhr erfolgte, um den Einfluß tageszeitlicher Schwankungen des Mitoseindex auszuschalten. Anschließend wurde aus den mit Chloroform getöteten Tieren sofort der Tumor mit Kapsel herauspräpariert und das Tumorgewicht durch Wägung bestimmt. Der Tumor wurde dann halbiert und in Alkohol-Formol-Lösung fixiert. Durch die terminale Wägung war nachträglich eine Korrektur der extern gemessenen Tumorgröße möglich.

2.1.8 Histologische und autoradiographische Aufarbeitung des Tumormaterials

- a) Einbettung: Einige Tage nach Fixierung erfolgte die Einbettung der Tumoren in Methylmethacrylat (Anhang 1). Von jedem Tumorbloc wurden mit dem Hartschnittmikrotom K der Firma Jung vorwiegend aus der Äquatorialen Ebene des Tumors 3 μ dicke Schnitte angefertigt und auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgebracht.
- b) Autoradiographie: Der Autoradiographie geht eine gründliche Entacrylierung der Schnitte mit Methylglykolacetat voraus. Die anschließend in 99 % Äthanol abgespülten und luftgetrockneten Schnitte wurden dann in der Dunkelkammer nach der sogenannten "dipping - Methode" mit NTB 2 Fotoemulsion beschichtet. Die gelartige Fotoemulsion wurde bei 42 °C im Wasserbad geschmolzen und mit aqua bidest 1:1 verdünnt. Die Objektträger wurden durch Eintauchen mit einer wenige μ dicken Schicht Fotoemulsion versehen und anschließend in einem lichtundurchlässigen Behälter 28 Tage im Kühlschrank aufbewahrt.
- Nach dieser Expositionszeit wurden die Präparate entwickelt und fixiert (Entwickler: D 19 b, Fixierbad: Kodak Unifix). Die entwickelten Autoradiogramme wurden dann mit Mayer's Hämalaun und Eosin gefärbt und mit Eukitt eingedeckt (Anhang 2).

2.2.1 Mikroskopische Auswertung der Autoradiogramme

Die mikroskopische Auswertung der autoradiographierten Präparate erfolgte unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektives (100-fache Vergrößerung) und eines Okulars mit 10-facher Vergrößerung.

Die Beschichtung der Präparate mit Fotoemulsion dient dazu, die Zellen sichtbar zu machen, die in der Synthesephase Tritium-Thymidin in die DNS-Ketten eingelagert haben. Kerne mit Markierung bilden sich in der Fotoemulsion durch ihre Überlagerung mit Silberkörnern ab. Da sie in der Ebene der Fotoemulsion liegen, also wenige μ über der Ebene des Tumor-

schnittes, muß beim Mikroskopieren ständig mit der Mikrometerschraube manipuliert werden.

Eine gewisse Schwierigkeit bei der Entscheidung, ob ein Zellkern markiert ist oder nicht, bereitet die in jedem Präparat mehr oder weniger auftretende Hintergrundmarkierung (Background oder Nulleffekt). Die Entscheidung, ob eine Zelle markiert oder unmarkiert war, wurde nach folgendem Schema getroffen:

- 0-2 Silberkörner über dem Zellkern: Zelle unmarkiert
- 5 Silberkörner und mehr über dem Zellkern: Zelle markiert
- 3-4 Silberkörner über dem Zellkern: Zelle markiert oder unmarkiert, in Abhängigkeit vom Nulleffekt

2.2.1.1 Bestimmung des Markierungsindex (labeling index, LI)

Als Markierungsindex gilt der Anteil markierter Zellen in der Gesamtpopulation, also:

$$LI = \frac{\text{Zahl der markierten Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \cdot 100 \%$$

Zur Bestimmung des LI wurden die jeweils eine Stunde nach Markierung entnommenen Tumoren ausgewertet und zwar 4 unbestrahlte Tumoren, 7 Tumoren der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe und 2 der mit 20 Gy bestrahlten Gruppe.

Für eine randomisierte Auswertung wurde die Zählung mittels eines Stichplattenokulars vorgenommen. Durch die vitalen Gebiete der Tumoren wurden in gleichmäßigem Abstand Linien gelegt und alle markierten und unmarkierten Zellen gezählt, die von diesen Linien geschnitten oder tangiert wurden. Insgesamt wurden pro Tumorschnitt mindestens 900 Zellen erfaßt.

2.2.1.2 Bestimmung des Prozentsatzes markierter Mitosen (PLM = percentage of labeled mitoses)

Als Anteil markierter Mitosen gilt das Verhältnis

$$PLM = \frac{\text{Zahl der markierten Mitosen}}{\text{Gesamtzahl der Mitosen}} \cdot 100 \%$$

Die vitalen Gebiete eines jeden Tumors wurden systematisch durchmikroskopiert und nach markierten und unmarkierten Mitosen abgesucht. Das Ziel dabei war, mindestens 100 Mitosen zu zählen. Allerdings waren bei einigen mit 30 Gy bestrahlten Tumoren weniger als 100 Mitosen im ganzen Präparat auffindbar.

Als Mitosen wurden nur Zellen gewertet, die sich in der Meta-, Ana- oder Telophase befanden. Zellen in der Prophase wurden dabei nicht berücksichtigt, weil ihre Erkennung nicht immer eindeutig war.

Jeder Stundenwert von 1 h bis 36 h wurde an zwei verschiedenen Tumoren ermittelt. Von jedem Tumor wurden zwei Schnitte gezählt, so daß pro Zeitpunkt aus 4 Werten ein Mittelwert gebildet werden konnte.

2.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde zusammen mit der Bestimmung des LI ermittelt, indem die Zahl der von den Linien geschnittenen oder tangierten Zellen pro Blickfelddurchmesser bestimmt wurde und dann der Mittelwert errechnet wurde. Gleichzeitig erfolgte die Registrierung der Häufigkeit nekrotischer Zellen.

2.2.2 Morphometrische Auswertung der Tumorschnitte

Mit einem Diaprojektor wurden die Präparate auf Zeichenpapier projiziert und die Umrisse der Strukturen abgezeichnet. Dabei kam es im wesentlichen darauf an, vitales Tumorgewebe von nekrotischem, bzw. durch Strahlung geschädigtem Gewebe zu differenzieren. Bei dieser Projektion war es relativ einfach, die Grenzen zwischen den beiden Gewebsanteilen einzuzeichnen. Pränekrotische Gebiete wurden dabei der Nekrose zugeordnet. Zur quantitativen Bestimmung des Verhältnisses von vitalem zu nekrotischem Gewebe wurden anschließend die jeweiligen Flächen mit der Papierschere ausgeschnitten und separat gewogen. Das Gewichtsverhältnis entspricht dem Flächenverhältnis von vitalem Gewebe zu Nekrose.

3. ERGEBNISSE

3.1 Unbestrahltes Harding-Passey-Melanom

3.1.1 Morphometrische Bestimmung der Tumornekrose

Schon beim Zerschneiden der herauspräparierten Tumoren fällt auf, daß die Schnittfläche nicht homogen ist, sondern solide Gewebsgebiete mit weichen, teils sogar breiförmigen Bezirken abwechseln. Ringsherum ist der ganze Tumor von einer derben Kapsel umgeben.

Bei mikroskopischer Betrachtung der gefärbten Tumorschnitte mit kleiner Vergrößerung zeigt sich, daß innerhalb der bindegewebigen Kapsel vitale und nekrotische Tumorgebiete abwechseln. Die Nekrosen sind spontan entstanden, da die Tumoren nicht bestrahlt wurden. Beim Vergleich der Schnitte verschiedener Tumoren sieht man, daß der Anteil an nekrotischen Gebieten etwas variiert, das vitale Gewebe allerdings überwiegt.

Um dies übersichtlich darzustellen und das Verhältnis von vitalem Gewebe zu Nekrose quantitativ abschätzen zu können, wurden die Schnitte von 4 exemplarisch ausgewählten Tumoren projiziert und schematisiert abgezeichnet. Dabei wurde zwischen vitalen, pränekrotischen und nekrotischen Gebieten unterschieden (Abb. 2-5). Als Pränekrose wurden Gebiete bezeichnet, die weder die Kriterien von vitalem Gewebe erfüllten, noch eindeutig der Nekrose zuzuordnen waren. Diese Gebiete bilden hauptsächlich den Übergang von vitalem Gewebe zu Nekrose.

Eine gewisse Ausnahme dabei bildet der Tumor in Abb. 5. Er besteht zum Überwiegenden Teil aus Nekrose und nur an zwei Polen sind größere zusammenhängende vitale Flächen sichtbar. In Tab. 1 sind die Werte der prozentualen Anteile von vitalem und nekrotischem Gewebe der 4 Tumoren zusammengefaßt.

	Anteil vitalen Gewebes in %	Nekrosean- teil in %	Verhältnis von vit. Gewebe/Nekrose
TU Abb. 2	65,4	34,6	2 : 1
TU Abb. 3	66,4	33,6	2 : 1
TU Abb. 4	68,5	31,5	2 : 1
TU Abb. 5	33,6	66,4	1 : 2

Tab. 1 Morphometrisch bestimmte Anteile von vitalem und nekrotischem Tumorgewebe in 4 unbestrahlten Harding-Passey-Melanomen

Läßt man den Tumor der Abb. 5 unberücksichtigt, unter der Annahme, daß es sich um eine Ausnahme handelt, so ergibt sich ein durchschnittliches Verhältnis von vitalem Gewebe zu Nekrose von 2 : 1.

Denkt man sich den ganzen Tumor in beliebig viele parallele Schnitte zerlegt und trifft man die Annahme, daß in jedem dieser Schnitte das Verhältnis von vitalem zu nekrotischem Gewebe dem oben angegebenen Wert entspricht, dann gilt dieses Verhältnis auch für die Volumina. Dies ist im Fall der unbestrahlten Tumoren gerechtfertigt, da aus der Auswertung einiger Äquatorialer Schnittebenen hervorgeht, daß die Nekrosen keine Prädilektionsstellen haben. Sie sind mehr oder weniger zufällig verteilt und treten nicht bevorzugt zentral oder peripher auf.

Unter dieser Voraussetzung besteht ein unbestrahltes HPM bei einem Durchschnittsgewicht von 500 mg etwa zu zwei Drittel aus vitalem Gewebe und zu einem Drittel aus Nekrose.

3.1.2 Histologisches Bild

Bei direkter Projektion des mikroskopisch gefärbten Präparats mit dem Diaprojektor war es relativ einfach, die Grenzen zwischen vital und nekrotisch erscheinendem Gewebe in der Zeichnung festzulegen. Bei genauer mikroskopischer Betrachtung (1000 x) zeigt sich aber, daß die Grenzen zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe nicht scharf gezogen werden können, sondern daß ein fließender Übergang besteht.

Im Mikroskop lassen sich sowohl das vitale, als auch das

nekrotische Gewebe noch weiter differenzieren.

Im Zentrum eines vitalen Gebietes findet man reichlich Mitosen und mit Tritium-Thymidin markierte Zellkerne. Man kann also annehmen, daß hier reichlich Zellproliferation stattfindet. Diese proliferierenden Gebiete liegen meist subkapsulär. Im Gegensatz dazu findet man im Zentrum der Nekrose ausschließlich eine amorphe, nicht näher differenzierte Koagulationsnekrose mit reichlich schollig angeordnetem Melanin, so daß man annehmen kann, daß es sich hier chronologisch um den ältesten Teil der Nekrose handelt. Zwischen diesen beiden Extremen besteht ein fließender Übergang, der sich folgendermaßen beschreiben läßt:

Entfernt man sich vom Zentrum des proliferierenden Gewebes, so nimmt allmählich die Zahl der Mitosen und der markierten Zellen ab, ohne daß sich die Zelldichte vermindert oder an den Zellkernen Veränderungen sichtbar werden. Diese Zone wird noch als vital betrachtet, scheint aber nicht mehr zu proliferieren. Dann nimmt die Zelldichte ab und es treten vereinzelt degenerativ veränderte Zellkerne auf. Diese Zone entspricht den als Pränekrose in Abb. 2-5 eingezeichneten Feldern. Eindeutig als Nekrose wird ein Tumorgebiet betrachtet, wenn fast alle Kerne derartige degenerative Veränderungen zeigen. Diese Veränderungen sind im wesentlichen die Kernpyknose, Karyolysis und Karyorhexis. Die Zelltrümmer gehen dann fließend in die amorphe Nekrose über. Die Übergangszone variiert in ihrer Breite.

Unabhängig davon findet man in vitalem Gewebe kleine Nekroseinseln mit reichlich Melanin, wo dieser fließende Übergang fehlt. Demgegenüber gibt es auch in nekrotischem Gewebe vereinzelt vitale Zellen, bzw. Zellinseln, die aber meist nicht markiert sind. Diese Zellinseln sind wahrscheinlich um zentrale Kapillaren angeordnet. Eine eindeutige Aussage ist aber nicht möglich, da bei der Einbettung in Methacrylat die Erythrozyten weitgehend eluiert werden.

3.1.3 Markierungsprofil in einem unbestrahlten Tumor

In Abb. 1 wird versucht, den beschriebenen Sachverhalt sche-

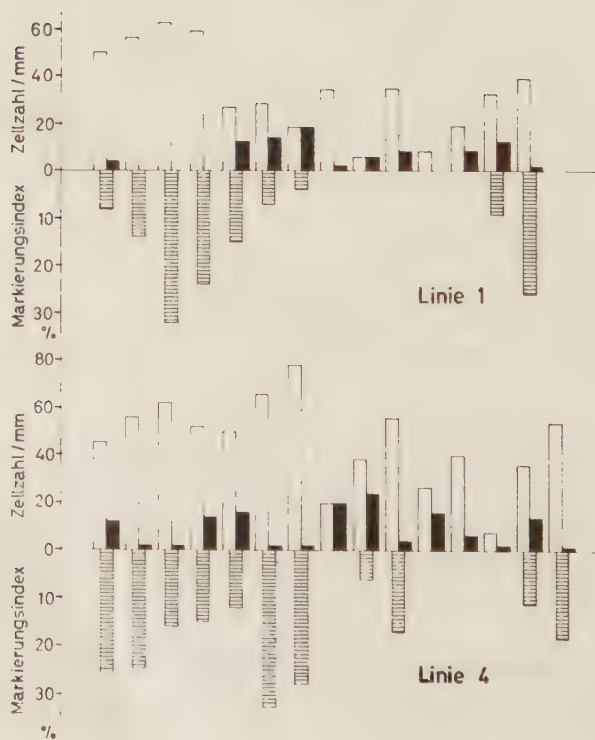


Abb. 1

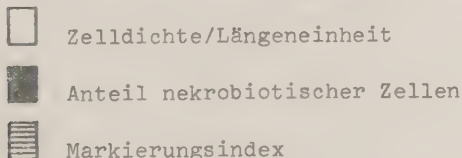
matisch darzustellen und annähernd quantitativ wiederzugeben. Durch den Tumorschnitt der Abb. 3 wurden 5 Linien gelegt und mikroskopisch alle vitalen und nekrotischen Zellen pro Gesichtsfeld gezählt, die von diesen Linien geschnitten oder tangiert wurden. Die Ergebnisse wurden nach folgenden Parametern ausgewertet:

- Zelldichte (Zellzahl/Längeneinheit)
- Markierungsindex (LI)
- Anteil nekrobiotischer Zellen

Für die Darstellung der Ergebnisse in Form eines Profils wurden die Werte von jeweils drei Gesichtsfelddurchmessern zusammengefaßt und als Säulen angegeben. Man sieht deutlich, wie der Markierungsindex von Zelldichte und Nekroseanteil abhängig ist. Mit zunehmender Zelldichte steigt der Markierungsindex, bei höherem Nekroseanteil verkleinert er sich oder es treten keine markierten Zellen mehr auf und der LI nimmt den Wert 0 an.

In Tab. 2 sind die Werte aller 5 Zählstriche aufgeführt. Der Markierungsindex ist in der Regel peripher höher als zentral, wie auch Hermens und Barendsen an einem Rhabdomyosarkom der Ratte gefunden haben (18).

Abb. 1 Verlauf von Zelldichte und Markierungsindex in einem unbehandelten Tumor (Tumor der Abb. 3).



Eine Säule stellt den Wert von 3 Gesichtsfeldern dar.

Linie 1			Linie 2			Linie 3			Linie 4			Linie 5		
a)	b)	c)	a)	b)	c)	a)	b)	c)	a)	b)	c)	a)	b)	c)
25	2	8	28	0	21	22	0	18	23	6	26	15	1	0
28	0	14	26	2	23	33	0	21	28	1	25	18	1	17
31	0	32	23	1	22	31	1	32	31	1	16	22	2	14
29	0	24	21	0	38	28	0	7	26	7	15	10	7	10
13	6	15	25	3	4	27	2	19	25	8	12	15	9	13
14	7	7	8	8	0	7	5	14	33	1	33	5	9	0
9	9	4	28	6	18	21	6	14	39	1	28	30	0	23
17	1	0	21	5	0	10	5	0	10	12	0	30	3	20
3	3	0	13	11	0	16	9	0	21	12	6	26	1	23
13	4	0	10	17	0	15	13	20	28	2	17	28	0	14
4	0	0	13	11	8	16	2	19	13	8	0	27	0	19
9	0	0	11	15	9	7	4	0	2	3	0	23	0	22
16	0	9	31	1	10	9	4	33	4	1	0	24	0	21
19	1	26	18	2	17	22	0	32	18	7	11			
			20	0	15	30	0	10	27	1	18			
			22	2	18	18	3	16						

Tab. 2 a) Zahl der vitalen Zellen b) Zahl der nekrobiotischen Zellen c) Markierungsindex LI im Tumorquerschnitt des unbestrahlten Tumors der Abb. 3. Die Einzelwerte entsprechen jeweils 3 zusammengefaßten Gesichtsfelddurchmessern = 0,5 mm.

3.1.4 Markierungsindex im unbestrahlten Tumor

Zur Bestimmung des LI wurden durch die Tumorschnitte Linien gelegt, wie in den entsprechenden Abbildungen 2-5 eingezeichnet. Der Abstand zwischen zwei Querstrichen entspricht dabei einem mikroskopischen Blickfeld. Die LI-Werte der Linien werden einzeln angegeben, um die Streubreite des LI im vitalen Gewebe bei dieser Bestimmungsmethode zu demonstrieren. In Klammern sind die absoluten Zahlen der markierten Zellen und der vitalen Zellen angegeben, aus denen der Markierungsindex errechnet wird. Zellen der pränekrotischen Zone, die praktisch immer unmarkiert sind, bleiben dabei unberücksichtigt. Im nekrotischen Gewebe werden weder markierte

noch unmarkierte intakte Zellen angetroffen. Der so ausgezählte LI ist somit repräsentativ für den Anteil markierter Zellen im gesamten vitalen Gewebe der Tumorschnitte.

Tumor Abb. 2

Wie aus der Abbildung zu ersehen, besteht der Tumorschnitt größtenteils aus vitalem Gewebe. Die Linien wurden in etwa gleichem Abstand durch den ganzen Tumor gelegt. Für die einzelnen Linien ergaben sich folgende LI-Werte:

Linie 1: LI = 12,8 % (40/313)

Linie 2: LI = 11,2 % (46/412)

Linie 3: LI = 11,1 % (36/325)

Linie 4: LI = 6,7 % (11/164)

Daraus ergibt sich für das vitale Gewebe dieses Tumors ein Gesamtmarkierungsindex von

$$LI_{\text{ges.}} = 11,1 \% \quad (130/1166)$$

Dieser Wert wird nicht als Mittelwert aus den Prozentwerten der einzelnen Linien berechnet, sondern als Quotient aller ausgezählten Zellen.

Um die Brauchbarkeit der linearen Auswertung zur Bestimmung des LI zu überprüfen, wurden bei diesem Tumor zusätzlich einige vitale Gebiete flächig, durch Auszählung sämtlicher Zellen in vielen Gesichtsfeldern, ausgewertet. Die Flächen sind in der Abbildung gestrichelt eingezeichnet.

Es ergaben sich für die einzelnen Flächen folgende Markierungsindizes:

Fläche 1: LI = 14,8 % (59/400)

Fläche 2: LI = 10,3 % (41/400)

Fläche 3: LI = 12,5 % (75/600)

Fläche 4: LI = 10,4 % (63/606)

Fläche 5: LI = 6,7 % (9/201)

Es errechnet sich ein Gesamtmarkierungsindex von

$$LI_{\text{ges.}} = 11,0 \% \quad (265/2408)$$

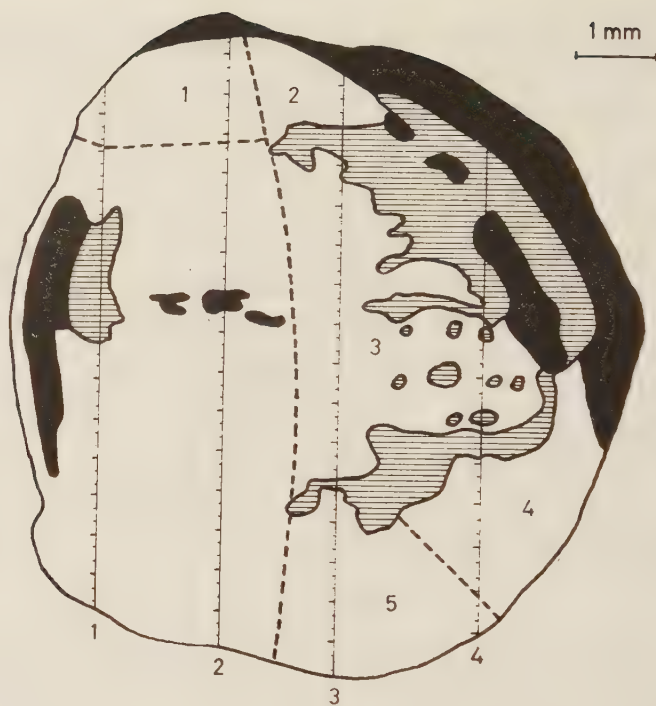
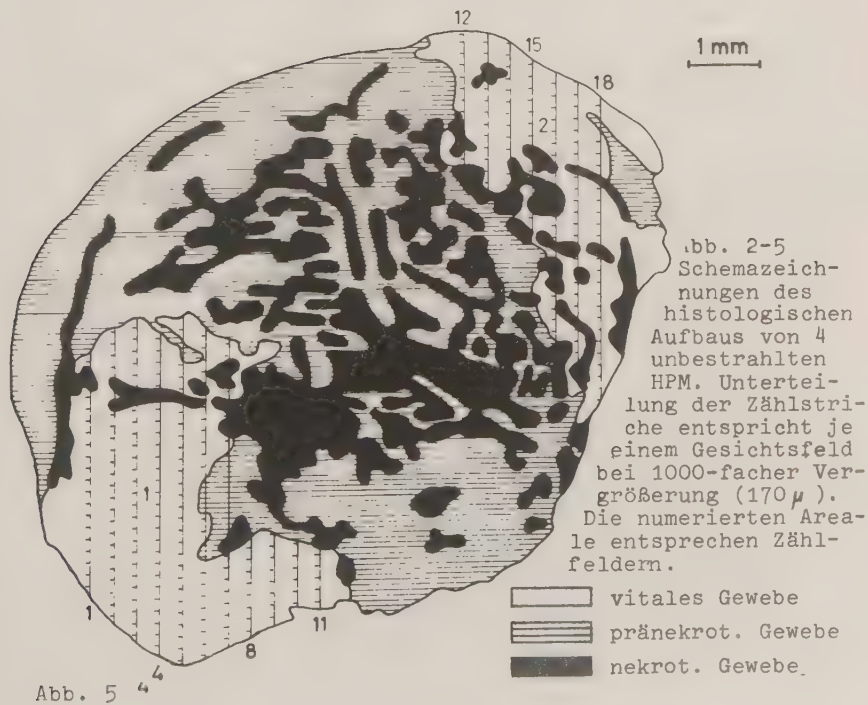
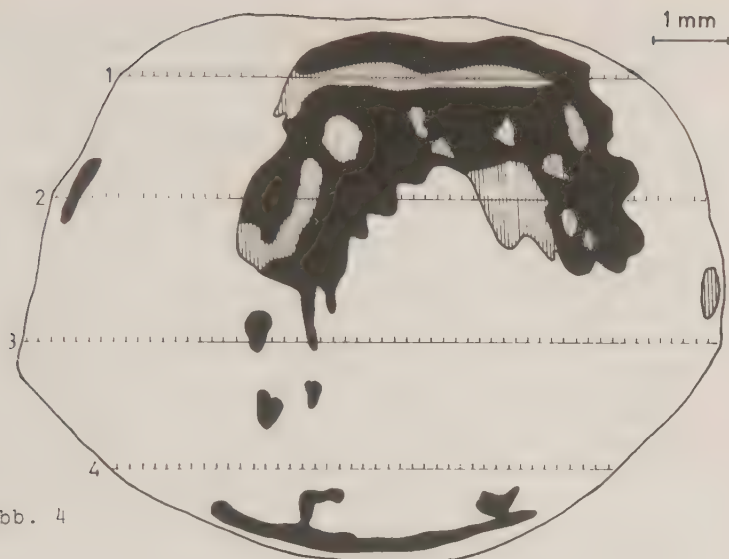


Abb. 2



Abb. 3



Die Werte der linearen und der flächigen Auswertung sind nahezu identisch. Dies spricht für die gute Brauchbarkeit beider Methoden.

Die Tumoren der Abb. 3 und Abb. 4 gleichen in ihrem histologischen Aufbau dem Tumor der Abb. 2. Es ergaben sich folgende LI-Werte:

Tumor Abb. 3

Linie 1:	LI = 15,7 %	(38/242)
Linie 2:	LI = 14,5 %	(47/325)
Linie 3:	LI = 17,3 %	(54/312)
Linie 4:	LI = 18,3 %	(62/339)
Linie 5:	LI = 17,3 %	(49/283)

$$LI_{\text{ges.}} = 16,7 \% \quad (250/1501)$$

Tumor Abb. 4

Linie 1:	LI = 17,9 %	(37/207)
Linie 2:	LI = 5,0 %	(14/281)
Linie 3:	LI = 14,9 %	(84/566)
Linie 4:	LI = 8,7 %	(25/287)

$$LI_{\text{ges.}} = 12,0 \% \quad (160/1341)$$

Tumor Abb. 5

Dieser Tumor hat nur zwei vitale Flächen, die an entgegengesetzten Polen lokalisiert sind. Nur in diesen beiden Arealen wurde der LI ausgezählt, wegen der kleinen Flächen mit relativ geringem Abstand der Zählstriche.

Fläche 1:

Linie 1:	LI = 15,6 %	(21/135)
Linie 2:	LI = 11,2 %	(24/215)
Linie 3:	LI = 9,3 %	(20/214)
Linie 4:	LI = 19,4 %	(40/226)
Linie 5:	LI = 13,3 %	(21/158)
Linie 6:	LI = 10,0 %	(8/ 80)
Linie 7:	LI = 17,8 %	(13/ 73)

Linie 8: LI = 16,9 % (11/ 65)

Linie 9: LI = 27,3 % (12/ 44)

Linie 10: LI = 9,3 % (4/ 43)

Linie 11: LI = 16,2 % (6/ 37)

$$LI_{\text{Fläche 1}} = 14,0 \% \quad (180/1290)$$

Fläche 2:

Linie 12: LI = 10,7 % (8/ 75)

Linie 13: LI = 15,0 % (9/ 60)

Linie 14: LI = 6,9 % (4/ 58)

Linie 15: LI = 6,8 % (4/ 59)

Linie 16: LI = 9,1 % (5/ 55)

Linie 17: LI = 7,1 % (9/127)

Linie 18: LI = 14,0 % (13/ 96)

$$LI_{\text{Fläche 2}} = 9,8 \% \quad (52/ 530)$$

$$LI_{\text{ges.}} = 12,7 \% \quad (232/1820)$$

Der LI-Wert dieses Tumors entspricht dem der anderen unbestrahlten Tumoren. Da der Tumor durch seinen hohen Nekroseanteil aber atypisch erscheint und als Ausnahme betrachtet wird, wird er für weitere Berechnungen, bei denen der Nekroseanteil eine wichtige Rolle spielt, nicht mitberücksichtigt. Aus den LI-Werten der Tumoren Abb. 2-4 errechnet sich für das unbestrahlte HPM bei einem mittleren Tumorgewicht von 500 mg ein Markierungsindex von

$$LI_{\text{unbestrahlt}} = 13,0 \% \pm 0,1$$

3.1.5 PLM-Kurve des unbestrahlten HPM und die daraus bestimmbare Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen

Bei einem durchschnittlichen Mitoseindex von 1,6 % im unbehandelten HPM war die Zählung markierter Mitosen ohne Schwierigkeit möglich. Die Mitosefiguren stellen sich in der Methacrylateinbettung besonders deutlich dar.

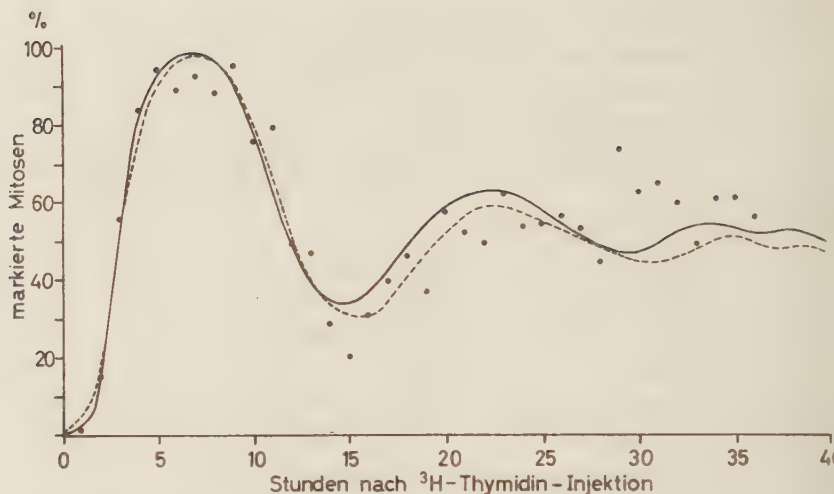


Abb. 6 PLM-Kurve der unbestrahlten Kontrolle
— Kurve 1: Ermittelt aus den Werten bis zur 36. Std.
--- Kurve 2: Ermittelt aus den Werten bis zur 25. Std.

Abb. 6 zeigt die Änderungen im Prozentsatz markierter Mitosen mit zunehmender Zeit nach Injektion von Tritium-Thymidin. Der erste Peak ist klar definiert, sein Maximum liegt nahezu bei 100 %. Das anschließende Tal erreicht nicht mehr den Nullpunkt. Der zweite Peak ist nur angedeutet, die Kurve flacht ab und strebt einem konstanten Wert zu. Die eingezeichneten Kurven sind nach einem Computerprogramm von Steel (33) berechnet.¹⁾ Das erste Minimum wäre dem Auge nach tiefer angepaßt worden. Da ab der 25. Stunde hohe Endwerte erreicht wurden, ergaben sich gewisse Schwierigkeiten bei der Berechnung der PLM-Kurve. Daher hat Steel in einer zweiten Berechnung nur die Werte von 1-25 Stunden verwendet. Es ergab sich dann die gestrichelte Kurve in Abb. 6, die nach Steel's Meinung den theoretischen Voraussetzungen besser entspricht.

1) Für die Auswertung danken wir Dr. G.G. Steel, Institute of Cancer Research, Department of Biophysics, Belmont, Sutton, Surrey.

Aus der Kurve hat der Computer folgende Werte für die einzelnen Zellzyklusphasen errechnet:

Kurve 1 (unter Verwendung der Werte bis zur 36. Stunde):

Mediane Zykluszeit:	$T_C = 15,4 \text{ h}$
Synthesephase:	$T_S = 8,8 \text{ h}$
G_2 -Phase + 1/2 Mitose:	$G_2 = 2,9 \text{ h}$
G_1 -Phase + 1/2 Mitose:	$G_1 = 2,4 \text{ h}$

Kurve 2 (unter Verwendung der Werte bis zur 25. Stunde):

Mediane Zykluszeit:	$T_C = 16,4 \text{ h}$
Synthesephase:	$T_S = 8,9 \text{ h}$
G_2 -Phase + 1/2 Mitose:	$G_2 = 2,9 \text{ h}$
G_1 -Phase + 1/2 Mitose:	$G_1 = 3,2 \text{ h}$

3.1.6 Bestimmung der Tumorverdopplungszeit

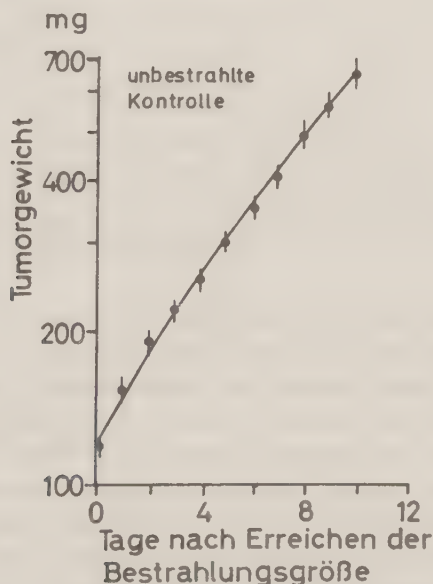


Abb. 7 Gemittelte Wachstumskurve von unbestrahlten Kontrollen, normiert auf den Tag, an dem eine Größe von 80-120 mg (Behandlungsgröße in den Versuchsgruppen) erreicht wurde. Die eingezeichneten Grenzen geben den mittleren Fehler des Mittelwerts an.

Aus 50 individuellen Wachstumskurven wurde die gemittelte Wachstumskurve in Abb. 7 erstellt. Dazu wurden die individuellen Wachstumskurven so geordnet, daß der Tag 0 dem Tag entspricht, an dem der Tumor sein Bestrahlungsgewicht zwischen 80 mg und 120 mg erreicht hatte. Aus den so normierten Wachstumskurven wurde für jeden Tag der Medianwert des Tumorgewichts bestimmt.

Bei exponentiellem Wachstum wäre bei dieser semilogarithmischen Darstellung eine Gerade zu erwarten. Da aber die Kurve mit steigendem Tumorgewicht stetig flacher wird, nimmt die Tumorverdopplungszeit mit steigendem Gewicht zu. Die Streuung der aus den individuellen Wachstumskurven abgelesenen Tumorverdopplungszeiten von 150 mg auf 300 mg und von 300 mg auf 600 mg läßt sich ausreichend genau durch eine Normalverteilung darstellen (Abb. 8). Der geometrische Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwerts betragen

$$T_{150/300} = 3,6 \pm 0,23 \text{ Tage}$$

$$T_{300/600} = 4,7 \pm 0,19 \text{ Tage}$$

3.2 Bestrahltes Harding-Passey-Melanom

3.2.1 Rezidiv nach Bestrahlung mit 30 Gy

3.2.1.1 Histologie und Morphometrie

Betrachtet man die Tumorrezidive zum Tötungszeitpunkt, so fällt auf, daß sie weniger kugelige Gestalt haben, sondern mehr oder weniger scheibenförmig flach der Thoraxwand anliegend gewachsen sind und teilweise höckerige Vorwölbungen aufweisen. Auf Grund der bereits beschriebenen strahlenbedingten Hautveränderungen ist es etwas schwieriger, die Tumoren herauszupräparieren, weil sie mit ihrer bindegewebigen Kapsel teilweise mit der Haut bzw. der Thoraxwand verbacken sind. Die Konsistenz der Tumoren ist insgesamt etwas derber als die der unbestrahlten Tumoren. Im Gegensatz zur Schnittfläche unbestrahlter Tumoren, in der konsisten-

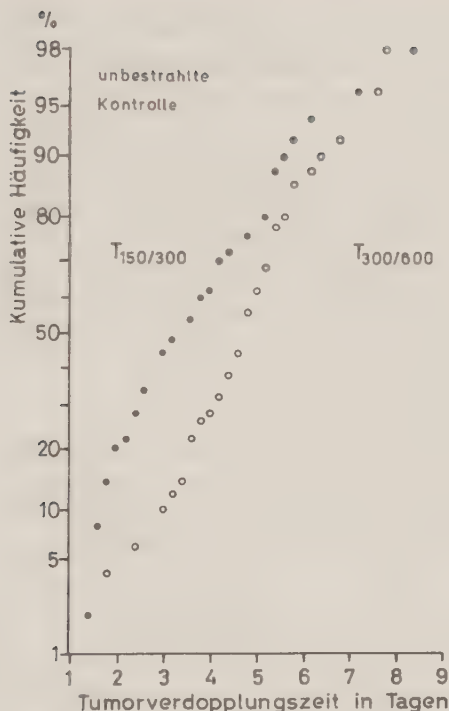


Abb. 8 Kumulative Verteilung der Tumorverdopplungszeit der unbestrahlten Kontrolle von 150 mg auf 300 mg und von 300 mg auf 600 mg

te mit weichen Gebieten abwechseln, ist die Schnittfläche der bestrahlten Tumoren mehr trocken und bröckelig. Der wesentliche Unterschied zum unbestrahlten Tumor fällt aber bei mikroskopischer Betrachtung sofort auf: Während im unbestrahlten HPM die amorphe, azelluläre Nekrose nur einen kleinen Anteil der Nekrose ausmacht, bildet sie im bestrahlten Tumor flächenmäßig den weitaus größten Anteil der Schnittfläche. Vitales Gewebe ist wesentlich geringer vorhanden. Zur quantitativen Bestimmung des Verhältnisses von vitalem Gewebe zu Nekrose wurden, wie beschrieben, schematisierte Zeichnungen der Tumorschnitte angefertigt. Die untersuchten 7 Rezidive sind in Abb. 9-15 dargestellt. Man sieht,

daß das vitale Gewebe ausschließlich an den Polen oder subkapsulär liegt. Für das Verhältnis von vitalem Gewebe zu Nekrose ergaben sich die Werte in Tab. 3.

	Anteil vitalen Gewebes in %	Nekroseanteil in %
TU Abb. 9	32,3	67,7
TU Abb. 10	31,8	68,2
TU Abb. 11	11,2	88,8
TU Abb. 12	29,7	70,3
TU Abb. 13	15,0	85,0
TU Abb. 14	9,3	90,7
TU Abb. 15	11,0	89,0

Tab. 3 Morphometrisch bestimmte Anteile von vitalem und nekrotischem Tumorgewebe in 7 mit 30 Gy bestrahlten Harding-Passey-Melanomen

Bildet man aus den Werten dieser 7 Tumorschnitte die Mittelwerte, so besteht das Tumorrezidiv nach Bestrahlung mit 30 Gy zu 20 % aus vitalem Gewebe und zu 80 % aus Nekrose. Bei genauer mikroskopischer Betrachtung der Präparate fällt auf, daß sich das vitale Gewebe nur quantitativ von dem des unbestrahlten Tumors unterscheidet. Qualitativ hat es denselben histologischen Aufbau und man findet auch den beschriebenen fließenden Übergang zur Nekrose. Das große, zentrale Nekrosegebiet besteht zum Überwiegenden Teil aus amorphem, melaninreichen Gewebe, in dem sich keine Zellstrukturen mehr unterscheiden lassen. Dieses Gewebe entspricht chronologisch gesehen der ältesten Nekrose. Nur am Übergang zum vitalen Gewebe und subkapsulär findet man noch Nekrobiosen, bestehend aus Kerntrümmern, Kernschatten und Zellresten.

Im Tumor der Abb. 9 läßt sich im Zentrum der alten Nekrose ein kleines Gebiet abgrenzen, das eventuell dem ursprünglich transplantierten Gewebstückchen entsprechen könnte.

3.2.1.2 Markierungsindex im bestrahlten Tumor (30 Gy)

In den sieben exemplarisch ausgewählten bestrahlten Tumoren der Abbildungen 9-15 wurde auch der LI bestimmt. Da aber im bestrahlten Tumor im Vergleich zur Gesamtfläche relativ wenig vitales Gewebe vorhanden ist, wurden die vitalen Gebiete flächig ausgewertet. Um einen fundierten Wert für den LI zu erhalten, mußte meist das ganze vorhandene vitale Gewebe ausgezählt werden. Lediglich der Tumor der Abb. 9 hatte soviel vitales Gewebe, daß eine Auswertung mit Zählstrichen möglich war.

Tumor Abb. 9

Die Lage der Linien ist in die Abbildung eingezeichnet.

Fläche 1 (Linien 1- 4): LI = 16,7 % (93/556)

Fläche 2 (Linien 5-15): LI = 17,9 % (80/446)

Fläche 3 (Linien 16-18): LI = 19,8 % (60/303)

$$LI_{ges.} = 17,8 \% \quad (233/1312)$$

Tumor Abb. 10

Fläche 1: LI = 17,4 % (278/1600)

Fläche 2: LI = 25,0 % (75/ 300)

Diese beiden Flächen bilden das gesamte vitale Gewebe dieses Tumors, für den sich folglich ein Gesamtmarkierungsindex ergibt von

$$LI_{ges.} = 18,5 \% \quad (353/1900)$$

Tumor Abb. 11

Fläche 1: LI = 13,1 % (104/789)

Fläche 2: LI = 17,3 % (42/242)

$$LI_{ges.} = 14,2 \% \quad (146/1031)$$



Abb. 9

Abb. 9-15 Schemazeichnungen des histologischen Aufbaus von 7 mit 30 Gy bestrahlten Harding-Passey-Melanomen. Die Unterteilung der Zählstriche entspricht je einem Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung (170μ). Die nummerierten Areale entsprechen Zählfeldern.

□ vitales Gewebe ▨ pränekrot. Gewebe ■ nekrot. Gewebe

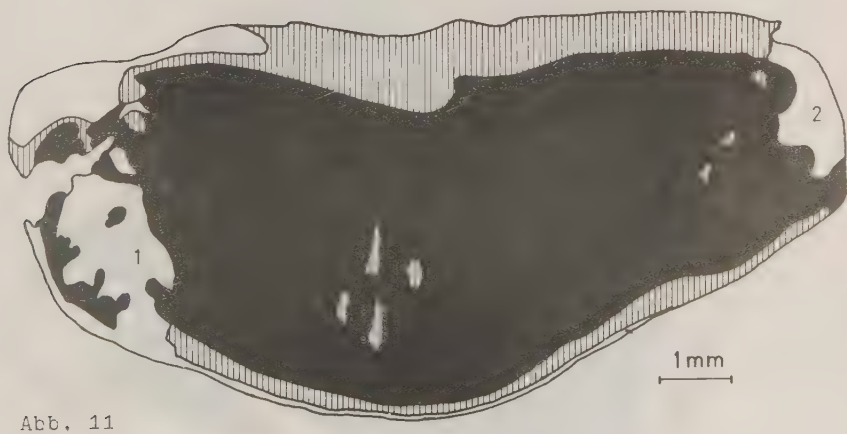
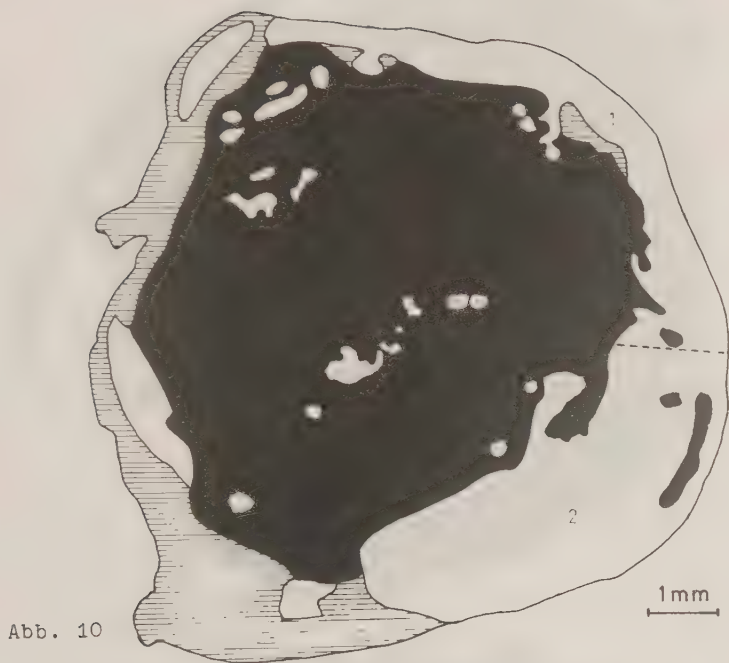




Abb. 12

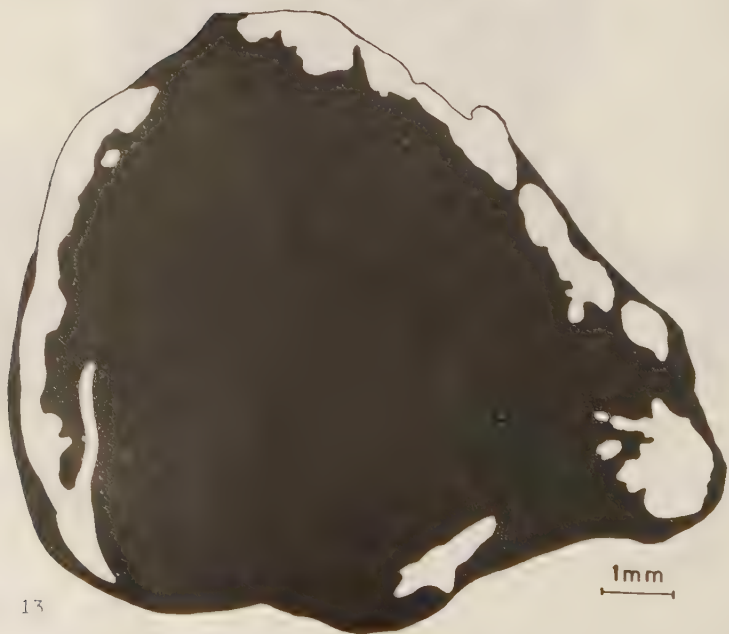


Abb. 13



Abb. 14



Abb. 15

Tumor Abb. 12

Fläche 1: LI = 14,6 % (73/ 500)

Fläche 2: LI = 15,0 % (210/1401)

Fläche 3: LI = 13,2 % (132/ 999)

$$LI_{\text{ges.}} = 14,3 \% \quad (415/2900)$$

Bei den Tumoren von Abb. 13-15 wurde der LI im ganzen vitalen Gewebe bestimmt:

Tumor Abb. 13

$$LI_{\text{ges.}} = 15,7 \% \quad (154/ 984)$$

Tumor Abb. 14

$$LI_{\text{ges.}} = 12,5 \% \quad (136/1092)$$

Tumor Abb. 15

$$LI_{\text{ges.}} = 12,3 \% \quad (112/ 912)$$

Aus den sieben LI-Werten der einzelnen Tumoren errechnet sich ein gemittelter Markierungsindex für das mit 30 Gy bestrahlte HPM von

$$LI_{30 \text{ Gy}} = 15,0 \% \pm 0,07$$

Dieser LI ist im Mittel um 2 % größer als der des unbestrahlten HPM.

3.2.1.3 PLM-Kurve des mit 30 Gy bestrahlten HPM und die daraus bestimmbare Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen

In Abb. 16 sind die in den Präparaten bestimmten Prozentsätze markierter Mitosen von 1 bis 36 Stunden nach Injektion von Tritium-Thymidin eingezeichnet. Aus diesen Werten hat der Computer die abgebildete Kurve ermittelt.

Als mediane Dauer der Zykluszeit und der Zyklusphasen ergaben sich folgende Werte:

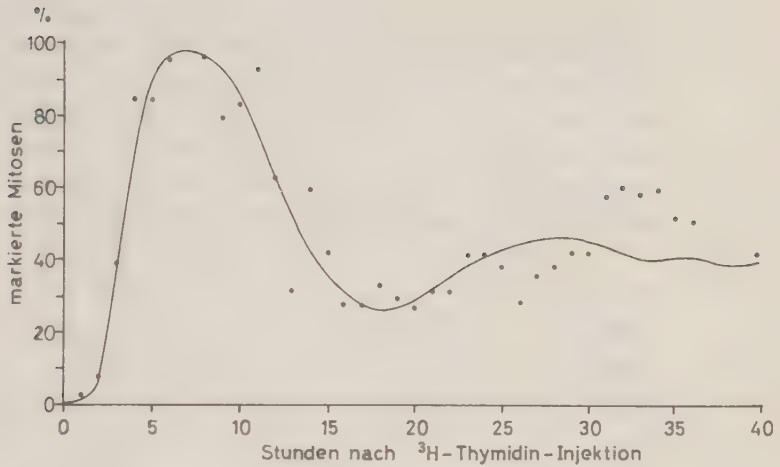


Abb. 16 PLM-Kurve von Tumorrezidiven nach Bestrahlung mit 30 Gy

Mediane Zykluszeit:	T_C	=	21,9 h
Synthesephase:	T_S	=	9,9 h
G_2 -Phase + 1/2 Mitose:	G_2	=	3,3 h
G_1 -Phase + 1/2 Mitose:	G_1	=	6,7 h

Im Vergleich zum unbestrahlten HPM ist die mittlere Zellzykluszeit beim bestrahlten HPM nach 30 Gy um etwa 6 bis 7 Stunden verlängert. Am stärksten differiert dabei die Dauer der G_1 -Phase, nämlich um etwa 4 Stunden.

3.2.1.4 Bestimmung der Tumorverdopplungszeit des Rezidivs (30 Gy)

Nach Bestrahlung der 80-120 mg schweren Tumoren nahm das Tumorgewicht noch einige Tage zu, im Mittel um etwa 60 mg (siehe Abb. 17). Dann war eine Stagnation der Größenzunahme erreicht und bei den meisten Tumoren sogar eine Abnahme des Tumorgewichtes meßbar. Nach dieser Phase trat der Tumor schließlich meist sehr dezidiert in ein erneutes Größenzunehmen ein. Diese Phase wird in der vorliegenden Arbeit als Rezidiv bezeichnet, obwohl dies mit der klassi-

schen, klinischen Definition für ein Tumorrezidiv nicht ganz übereinstimmt, weil zu keinem Zeitpunkt nach Bestrahlung eine völlige Remission nachweisbar war. Für jeden einzelnen Tumor wurde eine individuelle Wachstumskurve angelegt. Daraus wurde eine gemittelte Wachstumskurve erstellt (Abb. 17). Zum Vergleich ist auch die gemittelte Wachstumskurve unbestrahlter Tumoren eingezeichnet.

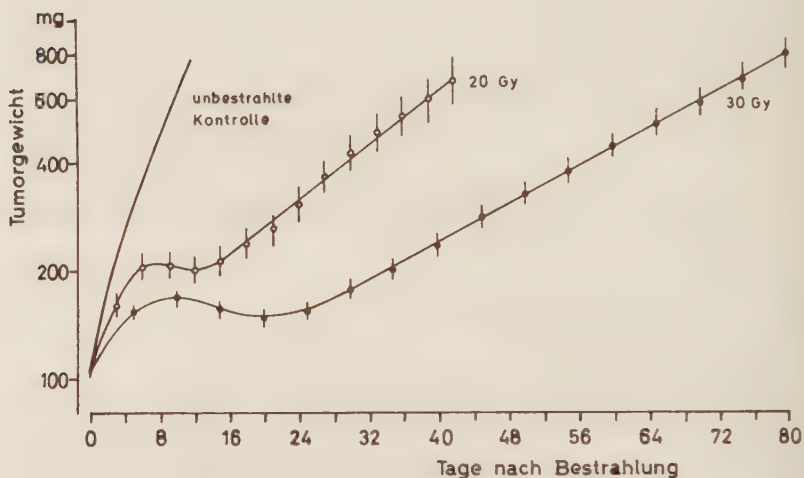


Abb. 17 Gemittelte Wachstumskurven nach Bestrahlung in Luft mit 20 Gy und 30 Gy. Eingetragene Punkte: Medianwerte $\pm$ S.E.

Ein Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit des Rezidivs ist die Steigung der Kurve im Wiederanstieg. In Abb. 17 ist zu sehen, daß das Tumorrezidiv praktisch exponentiell wächst, aber mit kleinerer Geschwindigkeit als die unbestrahlte Gruppe. Ein Parameter ist die Tumorverdopplungszeit von 300 mg auf 600 mg, weil diese beiden Gewichte im exponentiellen Teil der Kurve liegen. Von jedem einzelnen Tumor wurde die individuelle Tumorverdopplungszeit von 300 mg auf 600 m

bestimmt. Die Streuung dieser Werte um den Mittelwert lässt sich sehr präzise durch eine Normalverteilung darstellen (Abb. 18).

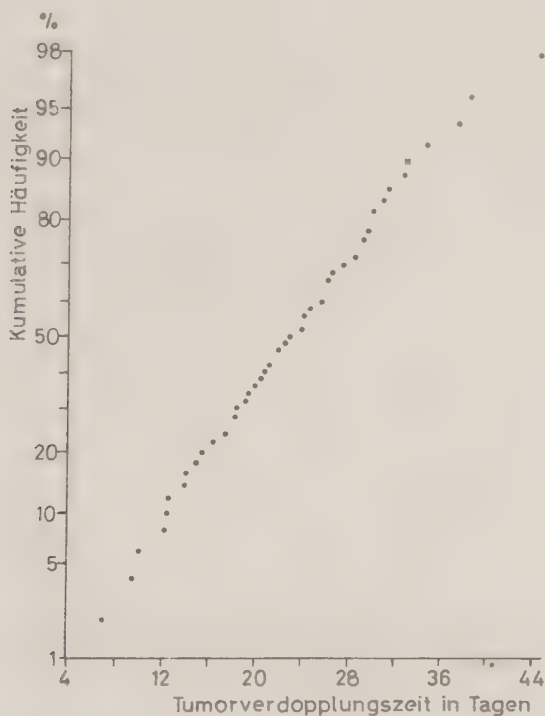


Abb. 18 Kumulative Verteilung der Tumorverdopplungszeit von 300 mg auf 600 mg nach Bestrahlung mit 30 Gy

Die mittlere Tumorverdopplungszeit beträgt 23,7 Tage, der mittlere Fehler des Mittelwertes 1,22.

Die unbestrahlte Kontrollgruppe hatte am Tötungstermin eine mittlere Tumorverdopplungszeit von 300 mg auf 600 mg von 4,7 Tagen. Die Tumorverdopplungszeiten unterscheiden sich also etwa um den Faktor 5.

Durch Schlechtweg wurde in einer parallel laufenden Untersuchung der dosisabhängigen Wachstumsverzögerung beim HPM

für die mit 30 Gy in Luft bestrahlte Gruppe eine mittlere Wachstumsverzögerung von 67,4 Tagen ermittelt (29). Sie ist definiert als die Zeit, die die Tumoren im Mittel brauchen, um ihr Bestrahlungsgewicht von 100 mg auf ein Terminalgewicht von 500 mg zu vervielfachen.

Um die exemplarisch ausgewählten Tumoren der Abb. 9-15 hinsichtlich ihrer Wachstumsverzögerung und ihrer Rezidivwachstumsgeschwindigkeit mit den entsprechenden Mittelwerten vergleichen zu können, sind ihre Kennwerte in Tab. 4 zusammengefaßt.

	$T_{100/500}$ (Tage)	$T_{300/600}$ (Tage)
TU Abb. 9	88	12,5
TU Abb. 10	50	11,6
TU Abb. 11	50	15,0
TU Abb. 12	129	20,0
TU Abb. 13	56	29,6
TU Abb. 14	38	19,8
TU Abb. 15	54	23,2

Tab. 4 Wachstumsverzögerung von 100 mg auf 500 mg und Tumorverdopplungszeit von 300 mg auf 600 mg der Tumoren von Abb. 9-15

Für diese Werte, sowie für weitere 50 ausgewertete Tumoren, die mit 30 Gy bestrahlt waren, ergab sich keine Abhängigkeit der Wachstumsverzögerung von der Tumorverdopplungszeit. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,13. Innerhalb einer Dosisgruppe besteht demnach keine Korrelation zwischen der Verdopplungszeit des Rezidivs und seiner Wachstumsverzögerung.

3.2.2 Rezidiv nach Bestrahlung mit 20 Gy

3.2.2.1 Histologie und Morphometrie

Sowohl vom makroskopischen Aspekt als auch bei mikroskopischer Betrachtung läßt sich von der Morphologie und vom histologischen Aufbau her kein Unterschied zu den mit 30 Gy bestrahlten Tumoren feststellen. In den Abbildungen 19 und 20 sind die äquatorialen Schnitte von 2 Rezidiven wiedergegeben und schematisch in Nekrose und vitales Gewebe differenziert. Man sieht, daß auch hier das vitale Gewebe subkapsulär liegt, und die zentrale Masse des Tumors aus amorpher Nekrose besteht. Beim Mikroskopieren von ca. 20 Schnitten verschiedener Tumoren zeigte sich, daß alle etwa den gleichen Aufbau haben. Daher wurden nur zwei Tumorschnitte exemplarisch dargestellt und das Verhältnis von vitalem Gewebe zu Nekrose bestimmt (Tab. 5).

	Anteil vitalen Gewebes in %	Nekrosean- teil in %
TU Abb. 19	18,3	81,7
TU Abb. 20	21,0	79,0

Tab. 5 Morphometrisch bestimmte Anteile von vitalem und nekrotischem Tumorgewebe in 2 mit 20 Gy bestrahlten Harding-Passey-Melanomen

Wie bei der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe bestehen die Tumoren zum überwiegenden Teil aus Nekrose.

3.2.2.2 Markierungsindex im bestrahlten Tumor (20 Gy)

In die Abbildungen sind wieder die Linien eingezeichnet, an Hand derer der LI bestimmt wurde. Auf die getrennte Aufführung der LI-Werte jeder einzelnen Linie wird in diesem Fall verzichtet. Für die einzelnen vitalen Gebiete der beiden Tumoren wurden folgende LI-Werte gezählt:

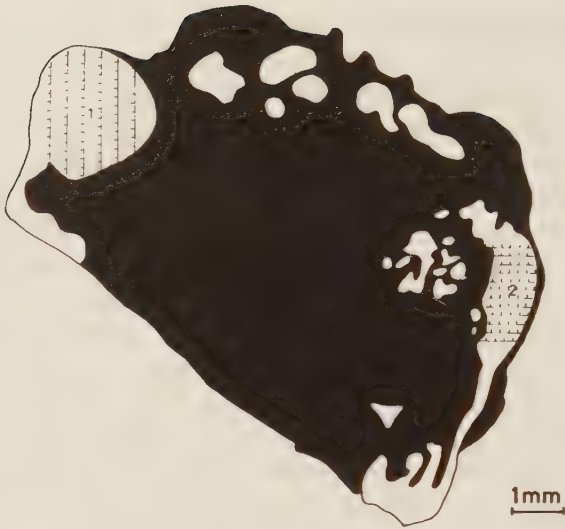


Abb. 19

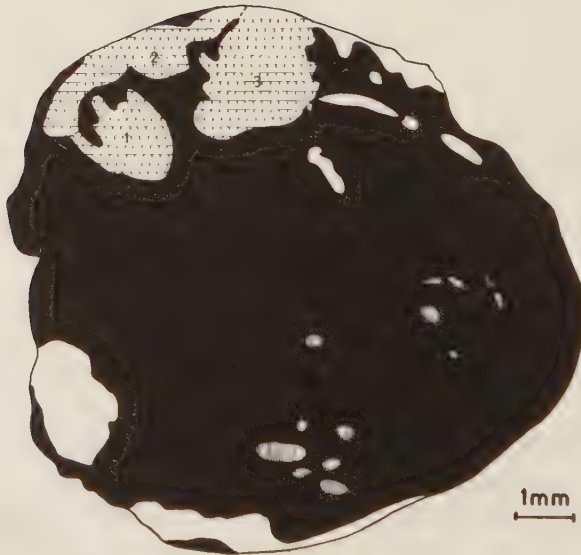


Abb. 20

Abb. 19-20 Schemazeichnungen des histologischen Aufbaus von 2 mit 20 Gy bestrahlten Harding-Passey-Melanomen. Unterteilung der Zählstriche entspricht je einem Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung (170μ).

	vitales Gewebe		pränekrot. Gewebe
	nekrot. Gewebe		

Tumor Abb. 19

Fläche 1: LI = 14,8 % (72/486)

Fläche 2: LI = 18,4 % (78/423)

$$LI_{ges.} = 16,5 \% (150/909)$$

Tumor Abb. 20

Fläche 1: LI = 13,8 % (52/378)

Fläche 2: LI = 14,2 % (71/499)

Fläche 3: LI = 17,1 % (169/988)

$$LI_{ges.} = 15,7 \% (292/1865)$$

Betrachtet man diese beiden ausgewählten Tumoren als repräsentativ, dann ergibt sich für das mit 20 Gy bestrahlte HPM ein Markierungsindex von

$$LI_{20 \text{ Gy}} = 16,1 \% \pm 0,02$$

Dieser LI unterscheidet sich nicht wesentlich von dem der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe.

3.2.2.3 Bestimmung der Tumorverdopplungszeit des Rezidivs (20 Gy)

Aus den individuellen Wachstumskurven wurde wieder eine mittlere Wachstumskurve erstellt (Abb. 17). Das Wachstumsverhalten der Tumoren nach Bestrahlung entspricht qualitativ dem der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe. Nach einer wesentlich kürzeren Latenzzeit setzt aber bereits das Rezidivwachstum ein. Dieses ist wieder exponentiell. Die Steigung der Kurve im Rezidiv ist größer als nach Bestrahlung mit 30 Gy, das heißt, das Rezidiv wächst schneller. Durch diese beiden Faktoren (kürzere Latenzzeit, größere Rezidivwachstumsgeschwindigkeit) erreichen die mit 20 Gy bestrahlten Tumoren im Mittel wesentlich schneller ihr fünffaches Bestrahlungsgewicht. Schlechtweg (29) ermittelte als Parameter dafür eine mittlere Wachstumsverzögerung von 35,6 Tagen. Um die Tumorverdopplungszeit des Rezidivs

exakt zu bestimmen, wurde von jedem Tumor die individuelle Verdopplungszeit von 300 mg auf 600 mg aus den Wachstumskurven abgelesen. Die Streuung der Werte lässt sich auch hier durch eine Normalverteilung darstellen (Abb. 21). Der Mittelwert liegt bei 17,7 Tagen. Der mittlere Fehler des Mittelwertes beträgt 1,74 d. Die Tumorverdopplungszeit des Rezidivs nach 20 Gy ist demnach im Mittel um 6 Tage kürzer als nach 30 Gy, die Wachstumsgeschwindigkeit dieses Rezidivs ist also größer.

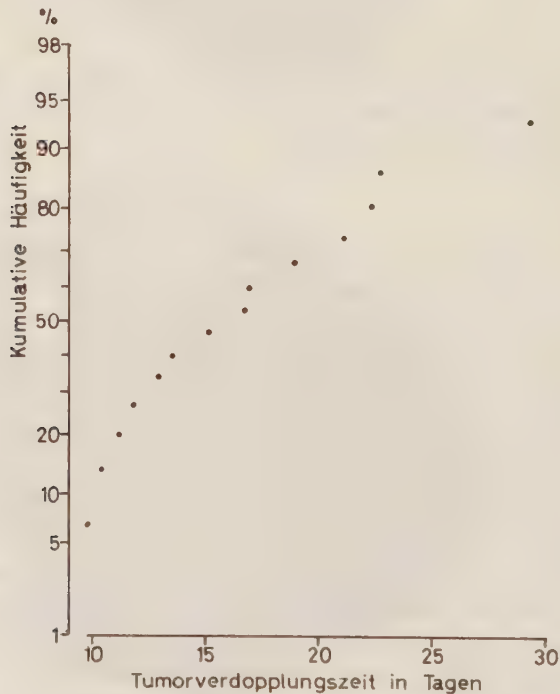


Abb. 21 Kumulative Verteilung der Tumorverdopplungszeit von 300 mg auf 600 mg nach Bestrahlung mit 20 Gy

4. DISKUSSION

Tumorrezidive nach lokaler subkurativer Bestrahlung weisen im allgemeinen eine niedrigere Wachstumsgeschwindigkeit auf als gleichgroße unbehandelte Tumoren, wie Messungen an transplantablen Tiertumoren verschiedener Histologie zeigen (1,6, 9,10,22,41). Im HPM verhält sich die Retardierung über einen größeren Dosisbereich streng dosisabhängig. So nimmt die Tumorerdopplungszeit der unbestrahlten Kontrolle von 4,7 Tagen auf 23,7 Tage nach Bestrahlung mit 30 Gy zu. Für die verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit können zwei Faktoren verantwortlich gemacht werden:

1. Strahlenbedingte Veränderungen in der Zellproliferationskinetik:
 - Verlängerung der Zellzykluszeit
 - Verminderung des Anteils proliferierender Zellen im vitalen Gewebe
 - Erhöhung des Zellverlustes
2. Strahlenbedingte gewebliche Veränderungen:
 - Verändertes Mengenverhältnis von vitalem Tumorgewebe zu Nicht-Tumorgewebe oder Nekrose

Diese Einzelkomponenten sind einer eindeutigen methodischen Bestimmung zugänglich.

In dieser Arbeit wird eine proliferationskinetische Beschreibung der Wachstumsverlangsamung versucht.

4.1 Vergleich der Dauer des Zellzyklus und seiner einzelnen Phasen der unbestrahlten Kontrolle und nach Bestrahlung mit 30 Gy

Zur Erklärung des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens wurde zunächst versucht, Aufschluß über eine eventuelle Veränderung der Zellzykluszeit proliferierender Zellen zu gewinnen. Die Zellzykluszeit wurde mittels der Methode des "Prozentsatzes-markierter-Mitosen" (PLM) bestimmt (28,34). Der Verlauf einer PLM-Kurve läßt sich kurz durch folgende Überlegungen erklären:

Infolge der kurzen Verfügbarkeitszeit von Tritium-Thymidin, das in einer einmaligen Injektion, einem sogenannten pulse label angeboten wird, werden in einer proliferierenden Population alle sich in der S-Phase befindlichen Zellen markiert (21). Haben die ersten Zellen dieser markierten Kohorte ihre G_2 -Phase durchlaufen und beginnen sie, sich zu teilen, so werden sie im Mikroskop als markierte Mitosen sichtbar. Da die G_2 -Phase, wie auch alle anderen Zyklusphasen, in ihrer Dauer einer deutlichen Streuung unterliegt, steigt der Anteil markierter Mitosen sigmoid an. Das Häufigkeitsmaximum der Dauer der G_2 -Phase liegt im Wendepunkt des Kurvenanstiegs. Der erste Kurvenpeak der PLM-Kurve entspricht somit dem ersten Durchgang der markierten Kohorte durch die Mitose. Danach nimmt der Prozentsatz markierter Mitosen wieder ab, da jetzt unmarkierte Kerne, die zum Zeitpunkt der Markierung die G_1 -Phase durchliefen, als Mitose sichtbar werden. Das nachfolgende Minimum erreicht nicht mehr den Nullpunkt, da durch die Streuung der Dauer der Zellzykluszeiten eine Durchmischung der unmarkierten und der markierten Kohorte erfolgt. Die zunehmende Desynchronisation hat zur Folge, daß das zweite Maximum niedriger liegt und die Steigung der Kurven in den aufeinanderfolgenden Wendepunkten ständig abnimmt. Der gesamte Kurvenverlauf entspricht einer gedämpften Schwingung. Schließlich strebt der Prozentsatz markierter Mitosen mit dem Erreichen völliger Desynchronisation einem konstanten Wert zu.

Grundsätzlich lassen sich die einzelnen Zellzyklusparameter graphisch in folgender Weise aus der PLM-Kurve bestimmen (28): Zellzykluszeit: Der Abstand zwischen erstem und zweitem Maximum der PLM-Kurve gibt die mittlere Zellzyklusdauer an. Besser ist T_C definiert durch den Abstand der 50 %-Werte der beiden ansteigenden Kurvenflanken.

G_2 -Phase: Abstand vom Zeitpunkt 0 bis zum Wendepunkt bzw. 50 %-Wert im ersten Kurvenanstieg.

S-Phase: Abstand der beiden 50 %-Werte im Anstieg und Abfall des ersten Gipfels.

G_1 -Phase: Nur als Differenz rechnerisch bestimmbar:

$$G_1 = T_C - (G_2 + S)$$

Die Dauer der Mitosephase ist hierbei je zur Hälfte in der G_2 - und der G_1 -Phase enthalten.

Die graphische Bestimmung, insbesondere von T_C ist allerdings mit Unsicherheit behaftet, da durch die schnelle Desynchronisation das zweite Maximum der Schwingung nicht mehr klar definiert ist. Daher wird diese Methode durch Computerberechnung des Kurvenverlaufs und der entsprechenden Zykluszeiten ergänzt bzw. ersetzt. In dem dazu von Barrett (2) und Steel (33) erstellten Computerprogramm sind die Charakteristika einer PLM-Kurve (gedämpfte Schwingung) enthalten, so z.B.:

- die einzelnen Zyklusphasen unterliegen unabhängig voneinander einer log - normalen Verteilung
- das zweite Maximum darf nicht höher sein als das erste, das dritte nicht höher als das zweite, usw.
- die Kurve strebt einem konstanten Wert zu
- die Steigung in den Wendepunkten der Flanken eines Peaks muß aufgrund der zunehmenden Desynchronisation aller Zellen immer kleiner sein als im vorhergehenden Peak

Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen konstruiert der Computer aus den eingegebenen Werten eine PLM-Kurve und berechnet Mittel- und Medianwerte für die Dauer der einzelnen Phasen des Zellzyklus inklusive Standardabweichung.

Die Medianwerte für die Dauer der Zykluszeit $T_C = 16,4$ h und der einzelnen Phasen $G_1 = 3,2$ h $\pm 12,4$ h, $S = 8,9$ h $\pm 2,4$ h, $G_2 = 2,9$ h $\pm 1,4$ h des unbestrahlten HPM liegen in der Größenordnung entsprechender Werte anderer bisher untersuchter Mäusetumoren (8,27,36). Die S-Phasendauer liegt an der oberen Grenze. Wie zu erwarten, weist die G_1 -Phase die stärkste Streuung auf, die Standardabweichung beträgt 12,4 h. Die Medianwerte der einzelnen Phasen geben jeweils die obere Schwelle für die 50 % schnellsten Zellen an. Da die einzelnen Zyklusphasen unabhängig voneinander streuen sollen, d.h., eine Zelle nicht in allen Phasen ausschließlich zu den 50 % schnellsten gehören kann, ist die mediane Zellzykluszeit länger als die Summe der einzelnen Medianwerte. Abb. 22 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Zellzykluszeiten im unbestrahlten HPM, wie sie nach digitalen Computerausdrucken gezeich-

net wurde. Es handelt sich um eine typische rechtsschiefe Kurve.

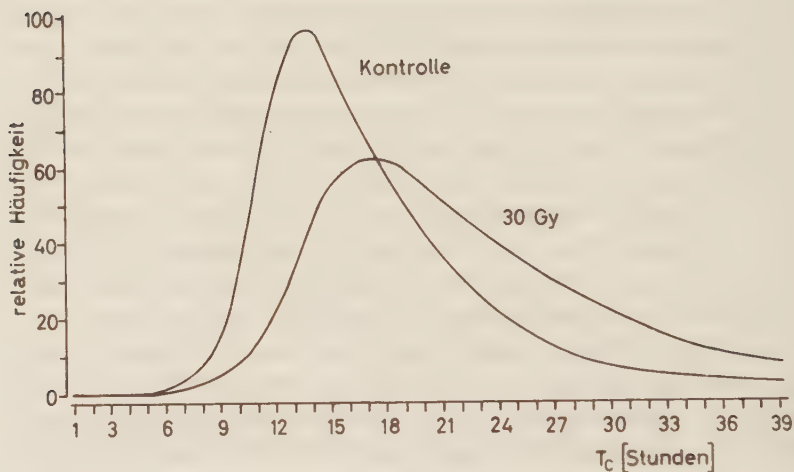


Abb. 22 Häufigkeitsverteilung der Zellzykluszeiten der Kontrolle und nach Bestrahlung mit 30 Gy

Von Hempel (16) wurde die Zellzykluszeit des unbestrahlten HPM (1 - 3 g schwere Tumoren) bereits früher an Hand einer PLM-Kurve bestimmt. Es fand sich dabei eine mittlere Zellzykluszeit von 26 Stunden. Die gefundenen Mittelwerte der Zyklusparameter waren: G₂-Phase = 3 h, S-Phase = 8 h, G₁-Phase = 13-14 h. Die Zellzykluszeit ist damit um fast 10 h länger als die mediane Zykluszeit von 16,5 h im eigenen Versuchsmaterial. Der wesentliche Unterschied liegt dabei in der Dauer der G₁-Phase. Für diese Diskrepanz gibt es keine stichhaltige Erklärung. Es handelt sich allerdings um eine andere Untergruppe des Stamms NMRI, außerdem wurden zur Transplantation keine Tumorstückchen sondern eine Zellsuspension

sion des Melanom-Homogenates verwendet. Die Untersuchungen betrafen wesentlich schwerere Tumoren (1-3 g) als in dieser Arbeit. Eine Verlängerung der Zykluszeit mit zunehmendem Tumoralter wurde bisher bei soliden Tumoren im allgemeinen verneint (14). Kürzlich wurde jedoch bei Lungenmetastasen des B16-Melanoms der Maus in einem Größenbereich zwischen 1 und 4 mm Durchmesser eine größenabhängige Verlängerung der Zykluszeit von 16,5 h bis 21,2 h beobachtet (13).

Nach Bestrahlung mit 30 Gy in Luft wurde in dieser Untersuchung eine Zykluszeit von 21,9 h, eine G_1 -Phasendauer von $6,7 \text{ h} \pm 16,1 \text{ h}$, eine S-Phasendauer von $9,9 \text{ h} \pm 3,9 \text{ h}$ und eine G_2 -Phasendauer von $3,3 \text{ h} \pm 1,1 \text{ h}$ gefunden.

Die im Rezidiv beobachtete Verlängerung der Zellzykluszeit um 5,5 h geht mit 3,5 h hauptsächlich zu Lasten der G_1 -Phase, aber auch die S-Phase ist im Mittel um 1 h verlängert. Die Häufigkeitsverteilung der Zellzykluszeiten in Abb. 22 zeigt, daß nach Bestrahlung sowohl das Häufigkeitsmaximum wie auch der Medianwert nach rechts verschoben sind.

In Tab. 6 (modifiziert nach Denekamp (12)) ist ein Vergleich der Zellzykluszeiten vor und nach Bestrahlung von verschiedenen Tumorsystemen gegeben. Bei diesen Tumoren wurde in wesentlich kürzeren Zeitabständen nach Bestrahlung die Zellkinetik untersucht. Es fand sich in 6 Fällen eine unveränderte, in je 2 Fällen eine verlängerte oder verkürzte Zellzykluszeit. Das Intervall zwischen Bestrahlung und Markierung bedingt allerdings eine Einschränkung: In den relativ kurzen Zeiten nach Bestrahlung von 2, 7 und 8 Tagen werden möglicherweise (abhängig von Dosis und Intervall) z.T. noch abortive Teilungen erfaßt, die den Teilungsrhythmus der Überlebenden klonogenen Zellen verwischen. Eine eindeutige Unterscheidung ist hier nur in vitro, beispielsweise bei der Stammbaumanalyse möglich (42). In den vorliegenden Versuchen stellt sich diese Schwierigkeit nicht, da zwischen Bestrahlung und Erreichen einer Tumorgröße von 500 mg mindestens 30 Teilungsschritte der Überlebenden Zellen liegen, bei denen durch Strahlen inaktivierte Zellen sicher eliminiert werden.

Tumor	Dosis (Gy)	Zeit zwischen Bestrahlung u. Markierung	Zellzykluszeit (Std.)	Wachstumsfraktion GF (%)	Zellverlust	Autoren
Hamster Backen-Ca	-	-	11 → 13 ↑	-	-	Brown (1970)(5)
Ratten Rhabdomyosarkom	20	14	25,5 → 12,5 ^{a)} 18,5 → 11,5 ^{b)}	30 → 25 ↓ dann vergrößert	60 → 140 ↑	Hermens, Barendsen (1969)(18)
Mäuse NCTC Fibrosarkom	20	-	17,5 → 17,5 ↔	-	-	Tubiana et al. (1968)(43)
Mäuse Adenocarcinom	2,1	2	14,5 → 11 ↓	87 → 100 ↑	33 → 0 ↓	Van Peperzeel (1970)(44)
Mäuse Mamma-Ca	15	14	16 → 15 ↔	37 → 40 ↔	70 → 76 ↔	Denekamp, Thomson (1971)(9)
Ratten Fibrosarkom RIB5	15	7	13,2 → 12,8 ↔	45 → 57 ↑	0 → 64 ↑	Denekamp, Thomson (1971)(9)
Ratten Fibrosarkom SSO	10	10	20,5 → 20,5 ↔	48 → 55 ↑	0 → 64 ↑	Denekamp, Thomson (1971)(9)
Ratten Fibrosarkom SSB1	10	28	39 → 39 ↔	60 → 43 ↓	25 → 68 ↑	Denekamp, Thomson (1971)(9)
Mäuse Adenocarcinom	12	8	13,6 → 19 ↑	25 → 50 ↑	-	Szczepanski, Trotter (1975)(36)
Mäuse Mamma-Ca	-	-	19,3 → 18,5 ↔	70 → 50 ↓	60 → 76 ↑	Nelson et al. (1970)(27)
Mäuse HPM	30	67	16,4 → 21,9 ↑	30 → 46 ^{c)} 20 → 9 ^{d)}	51 → 87 ↑	Gerte (1979)

a) Tumorzentrurn
b) Tumorpheripherie

c) Wachstumsfraktion der vitalen Fraktion.
d) Wachstumsfraktion des ganzen Tumors

Tab. 6 Änderung der Proliferation in tierexperimentellen Tumoren nach Bestrahlung

Eine lang anhaltende Veränderung der Proliferation konnte jedoch in Zellkulturen auch für überlebende Zellen nachgewiesen werden (3,30). Sinclair (30) zeigt, daß chinesische Hamsterzellen, die mit 15 Gy bestrahlt und in üblicher Weise inkubiert werden, eine Verschiebung des Kolonialgrößenspektrums mit einer Zunahme relativ kleiner Kolonien aufweisen. Diesen sogenannten Mikrokolonien liegen Zellen mit verlängerter Generationszeit und erhöhtem Zellverlust zugrunde. Gleiches Verhalten im Tumor vorausgesetzt, würden sich schnell proliferierende Klone nach 5-10 Teilungsschritten durchsetzen, auch wenn zunächst relativ mehr langsam wachsende Zellen durch die Bestrahlung selektiert werden.

Zur Diskussion steht noch, inwieweit gewebliche Veränderungen, wie sie im subkutanen Bindegewebe nach Bestrahlung eintreten, für die Zellproliferation limitierend sind. Ein strahlengeschädigtes Gefäßsystem, dessen Proliferation mit dem Wachstum des Tumorgewebes nicht mehr Schritt hält, kann zu einer Sauerstoffmangelversorgung des Tumors führen. Wie Born (4) in Versuchen mit Zellkulturen gezeigt hat, verlangsamt sich das Wachstum der Zellkolonien nahezu exponentiell mit zunehmender Dauer der Hypoxie. Auffallendster Befund ist die durch Hypoxie verursachte Verlängerung der S-Phase und der G_1 -Phase. Das Fehlen disseminierter Nekrosen in den vitalen Gewebsanteilen der Rezidive und die annähernd normale Proliferationsaktivität dieser Gebiete sprechen entschieden dagegen, daß die Mehrzahl der proliferationsfähigen Zellen unter Hypoxie steht (37,40).

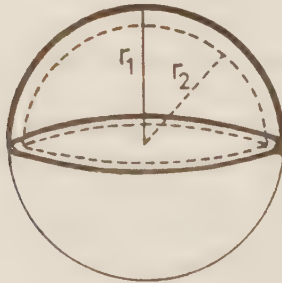
Für die starke Abbremsung des Wachstums der Rezidive sind die in vitalen Tumorteilen beobachteten zellkinetischen Veränderungen wie die Verlängerung der Zykluszeit um den Faktor 1,3 zweifellos von untergeordneter Bedeutung. Die Ursache der Abnahme der Wachstumsrate um den Faktor 3,9 wird in anderen Faktoren, besonders der geweblichen Zusammensetzung der Tumoren zu finden sein.

4.2 Volumenverhältnis von vitalem zu nekrotischem Gewebe

Zur Bestimmung einiger Wachstumsparameter ist die Kenntnis über das Volumenverhältnis von vitalem Gewebe zu Nekrose von Bedeutung. Beim unbestrahlten Tumor erscheint das nekrotische Gewebe im allgemeinen recht gleichmäßig verteilt. In diesem Fall hat der Satz von Delesse (um 1850) Gültigkeit, daß das Verhältnis der Volumina direkt dem Flächenverhältnis entspricht. Im bestrahlten Tumor wurde eine eher systematische Anordnung der Gewebsanteile gefunden. Vitales Gewebe liegt bevorzugt subkapsulär, Nekrose bildet den zentralen Anteil des Tumors. Es wurde daher zunächst in Frage gestellt, ob es zulässig ist, beim bestrahlten HPM das Flächenverhältnis der beiden Gewebsanteile auf das ganze Tumolvolumen zu beziehen. Aus den Äquatorialschnitten dreier Tumoren wurde auf Volumenmodelle geschlossen, die durch einfache geometrische Körper modellhaft dargestellt werden können.

Modell 1: "Kugelschale" (Volumenmodell von Tumor Abb. 10).

Das vitale Gewebe bedeckt als Kappe eine Kugelhälfte. Aus dem durch Wägung bestimmten Flächenverhältnis von vitalem Gewebe zu Nekrose läßt sich die relative Größe des inneren Radius r_2 errechnen ($r_1=1$).



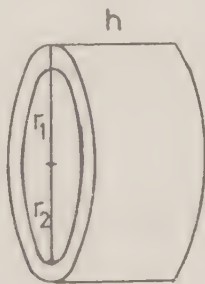
Flächenverhältnis: $\frac{\pi \cdot r_2^2}{\pi \cdot r_1^2} = 0,318$; $r_2^2 = 0,364$

Als Volumenverhältnis ergibt sich nach Kürzung konstanter Faktoren:

$$\frac{\pi \cdot r_2^2 \cdot h}{\pi \cdot r_1^2 \cdot h} = \frac{0,318}{1} = 31,8 \%$$

Modell 2: "Kreiszyylinder" (Volumenmodell von Tumor Abb. 11).

Das Tumorigen lässt sich durch einen Kreiszyylinder mit Radius r_1 und Höhe h darstellen. Das vitale Gewebe liegt wie ein Reifen um die zentrale Nekrose (Radius r_2). Das Verhältnis von $r_1:r_2$ lässt sich wieder aus dem Flächenverhältnis der beiden Gewebsanteile berechnen.



Flächenverhältnis: $\frac{\text{Fläche der Nekrose}}{\text{Gesamtfläche}} = \frac{88,8}{100} \approx \frac{9}{10}$

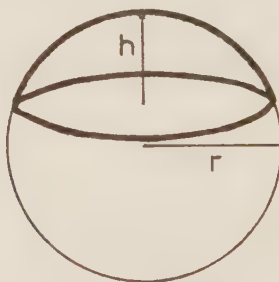
$$r_2 = \frac{9}{10} r_1$$

Gesamtvolumen: $\pi \cdot h \cdot r_1^2$

$$\begin{aligned}
 \text{Nekrose:} & \pi \cdot h \cdot r_2^2 \\
 \text{Verhältnis} & \frac{\text{vitales Gewebe}}{\text{Gesamt volumen}} : \frac{\pi \cdot h \cdot r_1^2 - \pi \cdot h \cdot \left(\frac{9}{10} r_1\right)^2}{\pi \cdot h \cdot r_1^2} = \\
 & = \frac{\frac{19}{100} \pi \cdot h \cdot r_1^2}{\pi \cdot h \cdot r_1^2} = 19 \%
 \end{aligned}$$

Modell 3: "Kugelsegment" (Volumenmodell von Tumor Abb. 12).

Das vitale Gewebe stellt ein Kugelsegment mit der Höhe h dar. Auf Grund des Flächenverhältnisses gilt: $h = \frac{2}{3}r$



$$\text{Volumen des Kugelsegments: } \frac{\pi \cdot h^2}{3} \cdot (3r - h)$$

$$\text{Volumenverhältnis} \quad \frac{\text{Kugelsegment}}{\text{Kugel}} : \frac{\frac{\pi \cdot h^2}{3} \cdot (3r - h)}{\frac{4}{3} \pi \cdot r^3} = 25,9 \%$$

Die Abweichung vom Flächenverhältnis kann in Sonderfällen also beträchtlich sein. Die Volumenmodelle beinhalten aber viele Unsicherheitsfaktoren, die ihre Anwendbarkeit in Frage stellen. Bei den beiden häufigsten Fällen (Tumor Abb. 10 und Abb. 12) tritt einmal eine Unterschätzung, im anderen Fall eine Überschätzung des Anteils vitalen Gewebes aus dem Flä-

chenschnitt auf. Unter der Annahme, daß auch im Fall der mantelförmigen Anordnung des vitalen Gewebes die Verteilung in Wirklichkeit weniger regelmäßig ist, beispielsweise in Form zusammenhängender, unregelmäßig dicker Segmente, erscheint der Fehler aus der Flächenbestimmung vernachlässigbar. Für die Berechnung weiterer Wachstumsparameter wurden daher die Flächenwerte verwendet.

4.3 Vorlesungen zur Proliferationskinetik des HfM vor und nach Bestrahlung

Neben den direkt bestimmten Parametern der Proliferation, wie L.I. und Zyklusphasen, sind für die Charakterisierung des Wachstums einige abgeleitete Größen von Bedeutung: Die Wachstumsfraktion (Growth Fraction), die potentielle Tumordopplungszeit und der Zellverlust.

Steel (31) hat in einer grundlegenden Arbeit das Wachstumsverhalten tierexperimenteller Tumoren theoretisch analysiert. Er gibt darin eine exakte mathematische Definition für die Wachstumsfraktion, die früher schon von Mendelsohn (26) eingeführt worden war und für den Zellverlust, der erstmals von ihm definiert wurde. Diese zellkinetischen Berechnungen basieren auf der Annahme, daß die Tumoren exponentiell wachsen. Für die Berechnung dieser Größen wurden die Formeln aus der Arbeit von Steel übernommen.

Ein Parameter, der die Proliferationskinetik nach Bestrahlung beeinflussen kann, ist die Wachstumsfraktion, die als Prozentsatz proliferierender Zellen im Tumor definiert ist. Die Wachstumsfraktion im vitalen Tumoranteil läßt sich aus folgenden Formeln herleiten und berechnen:

$$GF = \frac{LI_{exp.}}{LI_{pot.vit.}} \quad (1)$$

$$LI_{pot.vit.} = \frac{\lambda \cdot T_S}{T_C} \quad (2)$$

$$GF_{vit.} = \frac{LI_{exp.} \cdot T_C}{\lambda \cdot T_S} \quad (2) \text{ in } (1) \quad (3)$$

Da der Markierungsindex $LI_{exp.}$ im vitalen Gewebe bestimmt wurde, trifft die ermittelte Growth Fraction $GF_{vit.}$ nur für den vitalen Tumoranteil zu. Beim HPM nimmt die $GF_{vit.}$ der vitalen Tumorfraction nach Bestrahlung mit 30 Gy von durchschnittlich 0,30 auf 0,46 zu, d.h., der prozentuale Anteil proliferierender Zellen steigt um etwa 50 %. Ähnliche Veränderungen wurden schon an Adenokarzinomen der Maus und am Rattenfibrosarkom RIB 5 gefunden (Tab. 6). Es handelt sich um die drei Untersuchungen mit den relativ kurzen Intervallen zwischen Bestrahlung und Markierung, sodaß nicht ausgeschlossen werden kann, daß abortive proliferierende Zellen miterfaßt wurden.

Das unbestrahlte HPM besteht aber zu 33 % aus Nekrose. Um die GF für den ganzen Tumor zu berechnen, mußte ein Korrekturfaktor einbezogen werden, der die Proportion des vitalen Gewebes im ganzen Tumor (= vitale Fraction) berücksichtigt. Die Wachstumsfraction des ganzen Tumors unter Berücksichtigung der Nekrose errechnet sich folgendermaßen:

$$GF_{Tu} = GF_{vit.} \cdot \text{vit. Fraction} \quad (4)$$

Formal wird also der Tumor so behandelt, als ob das vitale Gewebe gleichmäßig über den ganzen Tumor verteilt wäre. Diese auf das Tumolvolumen bezogene GF_{Tu} beträgt für die unbestrahlte Kontrollgruppe im Mittel 0,30, für die bestrahlte Gruppe 0,09. Zwar kommt es im vitalen Gewebe nach Bestrahlung mit 30 Gy zu einem deutlichen Anstieg der Wachstumsfraction, versinkt man jedoch die Werte auf das gesamte Tumolvolumen, so ergibt sich ein Abfall der Wachstumsfraction, bedingt durch den ca. 2,5 mal höheren prozentualen Nekroseanteil nach Bestrahlung. Eine ähnliche Differenzierung wurde bisher von anderen Autoren nicht durchgeführt, sodaß es dafür keine Vergleichsmöglichkeiten gibt.

Eine weitere wichtige Kenngröße der Proliferation ist die potentielle Tumorverdopplungszeit. Dieser Parameter gibt an, wie schnell eine Population sich verdoppelt, unter der Annahme, daß kein Zellverlust stattfindet. $T_{pot.vit.}$ errechnet

sich nach der Formel

$$T_{\text{pot.vit.}} = \lambda \cdot \frac{T_S}{LI} \quad (5)$$

T_S : mittlere S-Phasendauer (8,9 h)

LI : Markierungsindex im vitalen Gewebe

λ : Korrekturfaktor ($2 \ln 2 > \lambda > \ln 2$), dessen Größe von der zeitlichen Lage der S-Phase im Zellzyklus abhängt und der die Altersverteilung exponentiell wachsender Populationen berücksichtigt. Erfahrungsgemäß kann λ bei tiereperimentellen Tumoren mit 0,8 angesetzt werden (31).

Diese $T_{\text{pot.}}$ trifft wiederum nur auf die vitale Tumorfraction zu. Trotz größerer GF bleibt sie der $T_{\text{pot.}}$ der Kontrolle etwa gleich, was sich im vorliegenden Fall dadurch erklärt, daß sich T_S und LI im bestrahlten Tumor gegenläufig verändern. Clifton und Jirtle (7) haben gezeigt, daß auch in vorbestrahltem Tumorbett wachsende Tumoren in ihren vitalen Anteilen etwa eine normale $T_{\text{pot.}}$ haben. Unter der Voraussetzung, daß sich das Verhältnis von Nekrose und vitalem Anteil kurzfristig nicht ändert, d.h., beide mit gleicher Rate wachsen, läßt sich die potentielle Tumorverdopplungszeit des ganzen Tumors nach folgender Formel errechnen:

$$T_{\text{pot.Tu}} = \frac{1}{\text{vit. Fraktion}} \cdot T_{\text{pot.vit.}} \quad (6)$$

Die $T_{\text{pot.}}$ des ganzen Tumors ist größer als die $T_{\text{pot.}}$ seines vitalen Anteils, weil durch den Korrekturfaktor der Nekroseanteil mitherücksichtigt wird. Beide Tumorverdopplungszeiten sind aber kürzer als die experimentell gefundenen realen Tumorverdopplungszeiten $T_{\text{exp.}}$, sowohl beim unbestrahlten, als auch beim bestrahlten HPM. Dieser Unterschied wird von Steel (31) auf Zellverlust zurückgeführt und formal als Verhältnis von Zellzuwachs zu Zellproduktion definiert. Der Zellverlustfaktor errechnet sich nach folgender Formel:

$$\phi = 1 - \frac{T_{\text{pot.}}}{T_{\text{exp.}}} \quad (7)$$

Setzt man in diese Formel für T_{pot} die Verdopplungszeit des vitalen Tumorangebots ein, so errechnet sich hieraus zunächst der Zellverlust aus dem vitalen Gewebe. Dieser Zellverlust aus dem vitalen Gewebe kann noch näher aufgeschlüsselt werden in einen Zellverlust in die Nekrose und einen Zellverlust nach außen ($\hat{=}$ externer Zellverlust), der dem Tumorumfang verloren geht. Dieser Volumenverlust errechnet sich, wenn man in Formel (7) für T_{pot} die potentielle Verdopplungszeit des ganzen Tumors einsetzt. Die Differenz aus den beiden errechneten Werten entspricht dem Zellverlust in die Nekrose.

Aus den Daten der unbestrahlten Kontrollgruppe und der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe wurden für jeden einzelnen Tumor, soweit der vitale Anteil morphometrisch bestimmt war, unter Anwendung obiger Formeln die einzelnen Parameter der Wachstumskinetik berechnet (Tab. 7 und 8). Nach Berechnung der Mittelwerte ist zu sehen, daß die vitalen Anteile des unbehandelten HPM bei einem mittleren Tumorgewicht von 500 mg einen Zellverlust aufweisen, der etwa 50 % der neugebildeten Zellen entspricht. Davon erscheint aber nur ungefähr die Hälfte im Tumorumfang als Nekrose, die andere Hälfte geht durch externen Zellverlust verloren. Anders verhält es sich bei der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe. Der Zellverlust beträgt im Mittel 87 % der neugebildeten Zellen. Diese 87 % lassen sich in 75 % Volumenzuwachs als Nekrose und 12 % externen Zellverlust aufgliedern. In diesem Fall wandert also der größte Teil des Zellverlustes in die Nekrose.

Diese Berechnungen beinhalten offensichtlich einige Unsicherheitsfaktoren: Für die Berechnungen wurde angenommen, daß die Wachstumsraten der vitalen Fraktion und der Nekrose zum Zeitpunkt der Bestrahlung (also bei ca. 500 mg) gleich groß sind. In Wirklichkeit kann aber zum Beispiel die Zuwachsrate der vitalen Fraktion kleiner sein als die der Nekrose. Ferner kann sich mit der Nekrotisierung eine gewisse Volumenreduktion verbinden, auch ist eine Resorption des nekrotischen Materials in begrenztem Umfang nicht auszuschließen. Diese drei Faktoren bewirken, daß man den Zellverlust in die Nekro

Tumor	vitale Frakt.	LI	GF _{vit.}	GF _{Tu}	T _{pot.vit.} (Tage)	T _{pot.Tu} (Tage)	T _{exp.} (Tage)	$\phi_{vit.}$	Verlust aus Tumorigen.	Verlust in Nekrose
TU Abb. 2	0,65	0,11	0,25	0,16	2,7	4,1	4,7	0,43	0,13	0,30
TU Abb. 3	0,67	0,17	0,37	0,25	1,8	2,7	4,7	0,62	0,43	0,19
TU Abb. 4	0,69	0,12	0,28	0,19	2,5	3,7	4,7	0,47	0,21	0,26
Mittel- wert	0,67	0,13	0,30	0,20	2,3	3,5	4,7	0,51	0,26	0,25

Tab. 7 Parameter der Wachstumskinetik des unbestrahlten HPM

Tumor	vitale Frakt.	LI	GF _{vit.}	GF _{Tu}	T _{pot.vit.} (Tage)	T _{pot.Tu} (Tage)	T _{exp.} (Tage)	$\phi_{vit.}$	Verlust aus Tumorigen.	Verlust in Nekrose
TU Abb. 9	0,32	0,18	0,55	0,18	1,9	5,8	12,2	0,85	0,47	0,38
TU Abb. 10	0,32	0,19	0,58	0,19	1,8	5,6	11,6	0,85	0,52	0,33
TU Abb. 11	0,11	0,14	0,43	0,05	2,3	20,8	15,0	0,84	-0,40	1,24
TU Abb. 12	0,30	0,14	0,43	0,13	2,3	7,8	20,0	0,89	0,61	0,28
TU Abb. 13	0,15	0,16	0,49	0,07	2,1	13,9	9,6	0,93	0,53	0,40
TU Abb. 14	0,09	0,13	0,40	0,004	2,6	28,3	19,8	0,87	-0,43	1,30
TU Abb. 15	0,11	0,12	0,37	0,04	2,7	23,2	20,8	0,87	-0,12	0,99
Mittel- wert	0,20	0,15	0,46	0,09	2,2	15,1	18,3	0,87	0,12	0,75

Tab. 8 Parameter der Wachstumskinetik des HPM nach Bestrahlung mit 30 Gy

se unterschätzt und den Zellverlust nach außen überschätzt. In der bestrahlten Gruppe fallen 3 der 7 Beispiele dadurch auf, daß die für den ganzen Tumor berechnete potentielle Verdopplungszeit jeweils größer ist als die experimentell gemessene reale Verdopplungszeit. Daraus berechnet sich dann formal ein negativer Zellverlust, bzw. in 2 Fällen ein Wert >1 für den Zellverlust in die Nekrose, oder anders ausgedrückt, es geht anscheinend mehr Gewebe in die Nekrose als überhaupt produziert wird. Dieser scheinbare Widerspruch, bedingt durch die kleine vitale Fraktion, kann folgendermaßen erklärt werden: Das vitale Gewebe von bestrahlten Tumoren wächst nicht kontinuierlich, ebenso ist die Bildung von Nekrose kein kontinuierlicher Vorgang. Es gehen vielmehr größere vitale Gewebsbezirke plötzlich zusammenhängend zugrunde. Wenn in einem histologischen Schnitt durch die Zufälligkeit der Schnittführung oder durch kurz zuvor zusammenhängend zugrunde gegangenes Gewebe große Nekrosebezirke und damit weniger vitales Gewebe als im Durchschnitt enthalten sind, ergibt sich bei der formalen Berechnung ein negativer Zellverlust, bzw. eine Zunahme der Nekrose, die die Zellproduktion übersteigt. Erst der Mittelwert der entsprechenden Parameter mehrerer Tumoren ermöglicht ein Bild über das Wachstumsverhalten.

Mit der detaillierten Beschreibung der Wachstumskinetik ist noch keine Erklärung gegeben, welcher Mechanismus dem erhöhten Zellverlust zugrunde liegt. Die Gründe dafür können teilweise zellulär fixiert sein. Dafür liegen Hinweise aus in vitro Untersuchungen bestrahlter Zellkulturen vor (3,30). Auch nach vielen Generationen werden noch Auffälligkeiten in der Proliferationskinetik beobachtet. So kommt es gehäuft zu Zelluntergängen mit defekten Mitosen, außerdem liegt eine größere Streuung der Generationszeiten vor. Im Tumor-Wirtssystem in vivo ist die Situation allerdings noch komplexer, weil die zellulären Effekte noch von den Strahlenschäden des Tumorbetts überlagert werden. Ein Wachstum des Tumors, vor allem über seine Ausgangsgröße bei Bestrahlung hinaus, setzt auch eine adäquate Proliferation der Blutgefäße (Kapillaren)

voraus. Tannock (38) und Tannock und Hayashi (39) erörtern, daß der begrenzen-^{de} Faktor im Tumorstromawachstum bereits normalerweise und ganz besonders nach Bestrahlung die Unfähigkeit des Gefäßsystems ist, mit der Proliferation der Parenchymzellen Schritt zu halten.

Experimentell abgrenzbar ist dieser Einfluß durch lokale Vorbestrahlung einer Implantationsstelle, eine sogenannte Tumorbettbestrahlung. Befunde aus der Literatur zeigen, daß nach Vorbestrahlung mit 10-30 Gy das Wachstum implantierten Tumorgewebes deutlich dosisabhängig verlangsamt ist (7,19,20, 35). Nach neueren Untersuchungen von Holler (20) am gleichen Versuchssystem (HPM und NMRI-Mäuse) ist das Wachstum von Implantaten aus rezidivierenden Harding-Passey-Melanomen (30 Gy) in einem normalen Tumorbett nicht verlangsamt. Ein unbehandeltes Implantat in einem mit 30 Gy vorbestrahlten Tumorbett wächst aber stark verlangsamt, auch wenn das Intervall zwischen Vorbestrahlung und Implantation annähernd die gleiche Dauer hat wie die Wachstumsverzögerung in diesem Versuch.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß sich das Tumorparenchym aus den überlebenden Zellen regenerieren kann, wobei allerdings bleibende leichte Veränderungen der zellulären Proliferation auftreten. Das geänderte Wachstumsverhalten des Rezidivs wird damit aber nicht erklärt. Von weitaus größerem Einfluß sind die persistierenden geweblichen Strahlenschäden im Tumorstroma und Tumorbett, die eine ungenügende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bedingen. Die untergehenden Zellen lassen sich zellkinetisch als erhöhter Zellverlust beschreiben, morphologisch finden sie ihren Ausdruck in der ausgeprägten Zunahme der Nekrose.

5. ANHANG: HISTOLOGISCHE TECHNIKEN

5.1 Einbettung von Gewebsscheibchen in Methacrylat

Die Einbettung besteht zunächst in einer Fixierung und Entwässerung, ähnlich wie bei Paraffineinbettung. Dann folgt stufenweise eine Überführung in monomeres Acrylat und Einbettungsgemisch, das anschließend polymerisiert wird.

- Fixierung in gepufferter Formol-Alkohol-Lösung (mindestens 48 Stunden).

Zusammensetzung: 4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 6,5 g Na_2HPO_4 wasserfrei in 800 ml H_2O lösen + 200 ml Formaldehydlösung 37%-ig + 570 ml Alkohol 99%-ig.

- Entwässerung im Einbettungsautomaten in der aufsteigenden Alkoholreihe bis Alkohol 99%-ig (7 bis 8 Stunden).
- Weitere Dehydrierung in Äthanol 100%-ig über Nacht auf dem Schüttler. Äthanol 100%-ig wird durch Entwässern von 99%-igem Äthanol über einem Molekularsieb (3 Å) gewonnen.
- Äthanol 100%-ig und Methacrylsäure-Methylester im Volumenverhältnis 1 : 1 (2 bis 3 Stunden).
- 2 x Methacrylat monomer (jeweils 2 bis 3 Stunden).
Nach Übertragung in Methacrylat monomer wird jedesmal im Exsiccator für ca. 5 Minuten evakuiert.
- Übertragung in das endgültige Einbettungsgemisch (über Nacht).

Zusammensetzung: 100 ml Methacrylsäure-Methylester + 30 ml Phthalsäuredibutylester + 2,5 g Dichlorbenzoylperoxid. Der Phthalsäuredibutylester wirkt als Weichmacher, das Dichlorbenzoylperoxid als Starter der Polymerisation.

- Anpolymerisieren des Gemisches (ca. 2 Stunden).
Vor der Inkubation im Schüttelwasserbad bei 45°C wird die Luft in der Probenflasche gegen N_2 ausgetauscht. Beginnende Polymerisation macht sich durch zunehmende Viskosität des Gemisches bemerkbar.

- Eingießen der Proben in Glasfläschchen, die mit perforierten Deckeln verschlossen werden. Anschließend Aushärten im Wasserbad bei ca. 45°C über mindestens 24 Stunden.

5.2 Hämalaun-Eosin Färbung der Autoradiogramme

- 15 Minuten Kardasewitsch-Lösung.
(Zusammensetzung: 180 ml Äthanol 80%-ig + 20 ml Ammoniak 25%-ig.)
- 5 Minuten Brunnenwasser.
- 5 Minuten aqua dest..
- 17 Minuten Mayers Hämalaun.
Anschließend kurz in 5%-ige Kalialaunlösung eintauchen, wodurch die Photogelatine ohne Verlust der Kernfärbung weitgehend entfärbt wird.
- 5 bis 10 Minuten Brunnenwasser.
- 8 bis 10 Minuten Eosin 0,1%-ig.
Dann rasch durch aufsteigende Alkoholreihe durchziehen.
- 2 x 96%-ig Äthanol.
- 2 x 99%-ig Äthanol.
- 2 x Xylol.
Anschließend eindecken mit Eukitt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Wie viele andere transplantable Tumorsysteme zeigt das Harding-Passey-Melanom der Maus nach Bestrahlung mit subkurativen Dosen in der Phase des Wiederwachstums eine deutliche Verlangsamung seiner Wachstumsgeschwindigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurden die proliferationskinetischen Ursachen dieses Verhaltens analysiert durch die Untersuchung der Zellzyklusparameter und der Morphometrie von unbestrahlten Tumoren und Rezidiven nach Bestrahlung mit 30 Gy in Luft. Die Untersuchung erfolgte jeweils bei einer Tumorgroße von etwa $0,5 \text{ cm}^3$, die von der unbestrahlten Kontrolle im Mittel 8,2 Tage nach Transplantation, von den mit 30 Gy in Luft bestrahlten Tumoren nach einer zusätzlichen Wachstumsverzögerung von im Mittel 59,2 Tagen erreicht wurde.

Die Analyse der Zellzyklusparameter mittels der "Prozent-markierte-Mitose-Methode" ergab für den unbestrahlten Tumor folgende Medianwerte: Generationszeit $T_C = 16,4 \text{ h}$, S-Phasendauer $T_S = 8,9 \text{ h}$, G_1 -Phasendauer $G_1 = 3,2 \text{ h}$, G_2 -Phasendauer $G_2 = 2,9 \text{ h}$. Nach Bestrahlung mit 30 Gy ergaben sich leicht verlängerte Werte: $T_C = 21,9 \text{ h}$, $T_S = 9,9 \text{ h}$, $G_1 = 6,7 \text{ h}$, $G_2 = 3,3 \text{ h}$.

Der Markierungsindex nach Pulsmarkierung beträgt jeweils im vitalen Gewebe in der Kontrolle 13,1 % und im Tumorezidiv 16,3 %. Unter Berücksichtigung der jeweiligen S-Phasendauer errechnet sich daraus eine praktisch gleich lange potentielle Verdopplungszeit von 2,2 bzw. 2,3 Tagen.

Die morphometrische Untersuchung zeigte einen deutlichen Unterschied im Aufbau unbestrahlter und rezidivierender Tumoren gleicher Größe. Der Nekroseanteil ist in bestrahlten Tumoren mit durchschnittlich 80 % wesentlich höher als in der unbestrahlten Kontrolle mit 33 %, wobei die Hauptmasse der Nekrose beim bestrahlten Melanom im Zentrum des Tumors liegt beim unbestrahlten hingegen überwiegend disseminiert angeordnet ist.

Bei der Berechnung der Wachstumsparameter für den ganzen Tumor wurde das Verhältnis von vitalem zu nekrotischem Gewebe

berücksichtigt. Die danach korrigierte potentielle Verdopplungszeit für den ganzen Tumor beträgt im Rezidiv 15,1 Tage, in der unbestrahlten Kontrolle 3,5 Tage.

Aus der Diskrepanz zur tatsächlichen Verdopplungszeit wurde der Zellverlustfaktor bestimmt. Aufgrund der morphometrischen Daten ist dies differentiell für die einzelnen Gewebsteile möglich. Für die vitale Fraktion im bestrahlten Tumor berechnet sich ein Zellverlustfaktor von 0,87, im unbestrahlten 0,51. Hiervon geht beim unbestrahlten HPM je die Hälfte nach außen und in die Nekrose verloren, beim mit 30 Gy bestrahlten HPM wandern $\frac{6}{7}$ des Zellverlustes in die Nekrose und nur $\frac{1}{7}$ geht dem Tumolvolumen verloren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARENDSEN, G.W., J.J. BROERSE: Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV X-rays: I. Effect of single exposures. Eur. J. Cancer 5, (1969), 373-391.
2. BARRETT, J.C.: A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data. J. Natl. Cancer Inst. 37, (1966), 443-450.
3. BEER, J.C.: Heritable lesions affecting proliferation of irradiated mammalian cells. Advances in Radiation Biol., im Druck.
4. BORN, R., O. HUG, K-R. TROTT: The effect of prolonged hypoxia on growth and viability of chinese hamster cells. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol 1, (1976), 687-697.
5. BROWN, J.M.: The effect of acute X-irradiation on the cell proliferation kinetics of induced carcinomas and their normal counterpart. Radiat. Res. 43, (1970), 627-640.
6. BROWN, J.M., D.R. GOFFINET, J.E. CLEAVER, R.F. KALLMAN: Preferential radiosensitization of mouse sarcoma relative to normal skin by chronic intra-arterial infusion of halogenated pyrimidine analogs. J. Natl. Cancer Inst. 47, (1971), 75.
7. CLIFTON, K.H., R. JIRTLE: Mammary carcinoma cell population growth in preirradiated and unirradiated transplant sites. Radiology 117, (1975), 459-465.
8. DENEKAMP, J.: The cellular proliferation kinetics of animal tumors. Cancer Res. 30, (1970), 393-400.
9. DENEKAMP, J., R.H. THOMLINSON: The cell proliferation kinetics of four experimental tumours after acute X-irradiation. Cancer Res. 37, (1971), 1279-1284.

10. DENEKAMP, J.: The response of a mouse sarcoma to single and divided doses of X-rays and fast neutrons. Br. J. Cancer 29, (1974), 292-298.
11. DENEKAMP, J., S.R. HARRIS: Studies of the processes occurring between two fractions in experimental mouse tumors. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 1, (1976), 421-430.
12. DENEKAMP, J., J.F. FOWLER: Cell proliferation kinetics and radiation therapy. Cancer, Vol. 6, (1977), 101-137.
13. DESAIVE, C., S. ZIETZ, C. NICOLINI: Size dependence of cell cycle parameters for lung metastases from B16 Melanoma. Cancer letters 4, (1978), 285-292.
14. FRINDEL, E., E.P. MALAISE, E. ALPEN, M. TUBIANA: Kinetics of cell proliferation of an experimental tumor. Cancer Res. 27, (1967), 1122-1131.
15. HARDING, H.E., R.D. PASSEY: A transplantable melanoma of the mouse. Journal Bact. Path. 33, (1930), 417-427.
16. HEMPEL, K.: Analyse des Zellcyclus der Melanocyten des Harding-Passey-Melanoms der Maus unter besonderer Berücksichtigung der "Growth-Fraction". Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 1, (1968), 15-30.
17. HERMENS, A.F., G.W. BARENDSEN: Cellular proliferation patterns in an experimental rhabdomyosarcoma in the rat. Europ. J. Cancer 3, (1967), 361-369.
18. HERMENS, A.F., G.W. BARENDSEN: Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after X-irradiation. Europ. J. Cancer 5, (1969), 173-189.
19. HEWITT, H.B., E.R. BLAKE: The growth of transplanted murine tumours in pre-irradiated sites. British J. Cancer 22, (1968), 808-824.

20. HOLLER, E.: Persönliche Mitteilung
21. KOBURG, E., W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen mit H-3-Thymidin über die Dauer der Desoxyribonucleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus. Biochem. Biophys. Acta 61, (1962), 229-242.
22. KUMMERMEHR, J., K-R. TROTT: Sensitization of a transplantable murine fibrosarcoma by partial synchronization with hydroxyurea. Radiobiological Research and Radiotherapy, Vol. 1, IAEA, Wien, (1977), 427-442.
23. LAIRD, A.K.: Dynamics of growth in tumors and in normal organisms. National Cancer Institute Monograph 30. Human Tumor Cell Kinetics, (1969), 15-28.
24. LLOYD, H.H.: Estimation of tumor cell kill from Gompertz Growth Curves. Cancer Chemother. Rep. 59, (1975), 267-277.
25. MC CREDIE, J.A., W.R. INCH, J.M. KRUUV, T.A. WATSON: The rate of tumor growth in animals. Growth 29, (1965), 331-347.
26. MENDELSON, M.L.: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H-mouse. III. The growth fraction. J. nat. Cancer Inst. 28, (1962), 1015-1029.
27. NELSON, J.S.R., R.E. CARPENTER, D. DURBORAW: Mechanisms underlying reduced growth rate in C3HBA mammary adeno-carcinomas recurring after single doses of X-rays or fast neutrons. Cancer Res. 36, (1976), 524.
28. QUASTLER, H., F.G. SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell Res. 17, (1959), 420-438.
29. SCHLECHTWEIG, K.: Zeitfaktoruntersuchungen der Strahlenwirkung auf das Harding-Passey-Melanom der Maus. Diss., Universität München, (1978).

30. SINCLAIR, W.K.: X-ray-induced heritable damage (small-colony formation) in cultured mammalian cells. *Radiat. Res.* 21, (1964), 584-611.
31. STEEL, G.G.: Cell loss from experimental tumors. *Cell Tissue Kinet.* 1, (1968), 193-207.
32. STEEL, G.G., L.F. LAMERTON: Cell population kinetics and chemotherapy. *Human Tumor Cell Kinetics*. National Cancer Institute Monograph 30, (1969), 29-50.
33. STEEL, G.G.: The cell cycle in tumours: An examination of data gained by the technique of labelled mitoses. *Cell Tissue Kinet.* 5, (1972), 87.
34. STEEL, G.G.: Growth kinetics of tumours. Cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Clarendon Press, Oxford, (1977).
35. SUMMERS, W.C., K.H. CLIFTON, H. VERMUND: X-irradiation of the tumor bed. *Radiology* 82, (1964), 691.
36. SZCZEPANSKI, L.v., K-R. TROTT: Post irradiation proliferation kinetics of a serially transplanted murine adenocarcinoma. *Br. J. Radiol.* 48, (1975), 200-208.
37. TANNOCK, I.F.: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br. J. Cancer* 22, (1968), 258-273.
38. TANNOCK, I.F.: Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 30, (1970), 2470-2476.
39. TANNOCK, I.F., HAYASHI, S.: The proliferation of capillary endothelial cells. *Cancer Res.* 32, (1972), 77-82.
40. THOMLINSON, R.H., L.H. GRAY: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer* 9, (1955), 539-549.

41. THOMLINSON, R.H., E.A. CRADDOCK: The gross response of an experimental tumour to single doses of X-rays. Br. J. Cancer 21, (1967), 108-125.
42. TROTT, K-R.: Das Proliferationsmuster unbestrahlter und röntgenbestrahlter Säugetierzellen in vitro (zeit-raffermikrokinematographische Studien). Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München, (1974).
43. TUBIANA, M., E. FRINDEL, E. MALAISE: The application of radiobiologic knowledge and cellular kinetics to radiation therapy. Am. J. Roentgenol. 102, (1968), 822.
44. VAN PEPERZEEL, H.A.: Patterns of tumor growth after irradiation: A comparative study in men, dogs and mice. Ph. D. thesis, University of Amsterdam, (1970).
45. VAN PEPERZEEL, H.A.: Effects of single doses of radiation on lung metastases in man and experimental animals. Europ. J. Cancer 8, (1972), 665-675.

LEBENS LAUF

Name: Michael Gerte

geboren am: 11.1.1952

in: München

Schulen: 1958 - 1962 Volksschule in München-Laim
und Volksschule in München-Pasing
1962 - 1971 Neusprachliches Gymnasium in
Gräfelfing

Studium der
Medizin: Ludwig-Maximilians-Universität München
WS 1971/72 - SS 1978

Prüfungen: Oktober 1972: Vorphysikum
April 1974: Physikum
März 1975: I. Abschnitt der
Ärztlichen Prüfung
März 1977: II. Abschnitt der
Ärztlichen Prüfung
April 1977 - Mai 1978: Praktisches Jahr
Oktober 1978: III. Abschnitt der
Ärztlichen Prüfung

Approbation: 30. Oktober 1978

